
Akadémiai doktori értekezés

**HEMATOLÓGIAI ÉS IMMUNOLÓGIAI
BETEGSÉGEK ÖRÖKLETES TÉNYEZŐINEK
VIZSGÁLATA**

dr. Tordai Attila

*Országos Gyógyintézeti Központ, Hematológiai és
Immunológiai Intézet*

Budapest, 2005.

Tartalomjegyzék

I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	3
II. VIZSGÁLT POPULÁCIÓK, ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	4
II.1. POPULÁCIÓK	4
II. 2. MÓDSZEREK	6
II.2.1. DNS-izolálás	6
II.2.2. Primer tervezés	6
II.2.3. Polimeráz láncreakció (PCR)	8
II.2.4. Genotipizálás valós idejű PCR-rel	8
II.2.5. Mikroszatellita-elemzés	9
II.2.6. Southern blotting	9
II.2.7. Hosszú PCR	9
II.2.8. Közvetlen szekvencia-elemzés	11
II.2.9. Statisztikai módszerek	12
III. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	12
III.1. MONOGÉNES HEMATOLÓGIAI/IMMUNOLÓGIAI KÓRKÉPEK.....	12
III.1.1. Haemophilia	12
III.1.2. Örökletes angioneurotikus oedema és mutációs adatbázis	30
III.1.3. Fiatalkori (juvenilis) hemokromatózis	43
III.2. GENETIKAI KOCKÁZATI TÉNYEZŐK POPULÁCIÓS VIZSGÁLATAI.....	50
III.2.1. Egyes típusú örökletes hemokromatózis	50
III.2.2. Egyes típusú örökletes hemokromatózis és myelodysplasia	60
III.2.3. FV Leiden populációgenetika	64
III.2.4. A valós idejű PCR-es genotipizálás körülményeinek vizsgálata	67
IV. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK	73
V. A TÉMAKÖRBEN A KANDIDÁTUSI ÉRTEKEZÉS BEADÁSA ÓTA	
SZÜLETETT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	76
V.1. A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK (EMLÍTÉSÜK	
SORRENDJÉBEN)	76
V.2. EGYÉB SAJÁT NEMZETKÖZI KÖZLEMÉNYEK (IDŐRENDI SORRENDJÉBEN).....	77
V.3. EGYÉB SAJÁT HAZAI KÖZLEMÉNYEK (IDŐRENDI SORRENDJÉBEN)	78
VI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	79
VI. IRODALOMJEGYZÉK	80
VII. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	88
VIII. FÜGGELÉK	88

I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Más szakterületekhez hasonlóan a hematológia és immunológia területein is folyamatosan emelkedik azon kórképek száma, amelyek esetében bizonyítottá és ismertté válik a pontos genetikai háttér. Ezeknél a betegségcsoportoknál számos esetben derül fény monogénis genetikai mechanizmusra. Ezek az általában viszonylag kis számú beteget érintő kórképek hatékonyan tanulmányozhatók genetikai laboratóriumi eszközökkel. Egy másik fontos terület a genetikai kockázati tényezők vizsgálata, amely általában jelentősebb számú beteget érintő kórképeknél merül fel, ugyanakkor a genetikai kockázati tényezők szerepe a betegségek kialakulásában kevésbé egyértelmű. A jelen dolgozatban bemutatott, mintegy 10 évet felölelő időszak során az általam vezetett kutatócsoport alapfeladata a klinikai orientáltságú genetikai kutatómunka eszközeinek meghonosítása, az újabb kísérleti módszerek, eljárások folyamatos átvétele, és a kiértékeléshez, összehasonlításához elengedhetetlen feltételek (számítógépes programok, statisztikai módszerek) megteremtése volt.

A kialakított és folyamatosan fejlesztett infrastruktúra segítségével a monogénis betegségek, illetve populációgenetikai kutatások területén a következő **célkitűzéseink** voltak: (i) Közvetett és közvetlen vizsgálatokra alkalmas molekuláris genetikai módszerek beállítása és születés előtti, illetve hordozó-diagnosztika végzése A és B típusú örökletes hemofiliában (HA és HB). (ii) Olyan lehetséges mechanizmusok tanulmányozása, amelyek a VIII. véralvadási faktor gén egyes betegségkókozó ritka szerkezeti változatai keletkezéséhez vezethetnek. (iii) Kóroki mutációk felderítése örökletes angioneurotikus oedemában (HANO) és fiatalkori hemokromatózisban (JH). (iv) A mutáció-keresési munkában résztvevő csoportok nemzetközi együttműködését elősegítő internetes adatbázis kifejlesztése, valamennyi közölt C1 inhibitor génmutáció összegyűjtése. (v) A hazai

populációgenetikai mérésekhez szükséges populációs minták összegyűjtése, és klinikai szempontból fontos örökletes kockázati tényezők előfordulási gyakoriságának megállapítása a hazai átlagpopulációban. (vi) A valós idejű PCR-technikával végzett genotipizálás körülményeinek szisztematikus elemzése.

II. VIZSGÁLT POPULÁCIÓK, ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

II.1. POPULÁCIÓK

Az értekezés beadásakor 158, egymással rokoni kapcsolatban nem álló, A típusú hemofiliában (HA) szenvedő beteg, illetve család anyagát (vér-, DNS-minta, információ) tároltuk. A családok súlyosság szerinti megoszlása a következő volt: 128 súlyos, 22 középsúlyos és 8 enyhe HA. Szintén tároltuk 26 B típusú hemofiliában (HB) szenvedő család (14 súlyos, 9 középsúlyos és 3 enyhe HB) anyagát. A betegek gondozása és a genetikai tanácsadás az Országos Hemofilia Központban, a Heim Pál Gyermekkórházban, valamint az országban működő regionális Hemofilia Gondozókban történt. A VIII. és IX: véralvadási faktorok aktivitása és az egyéb koagulációs paraméterek meghatározása, valamint a családfa adatok felvétele a gondozást végző orvos irányításával történt. A betegek és az érintett családtagok a szóbeli tájékoztatást követően írásbeli, tájékoztatáson alapuló beleegyező nyilatkozatot írtak alá. A hordozó és prenatális vizsgálatok eredményét titkosan kezeltük, csak a vizsgálatot kérő orvosnak adtuk meg. A prenatális vizsgálatokhoz szükséges chorion boholy minták (CVS) vételét és citogenetikai vizsgálatát az Országos Gyógyintézeti Központ Szülészeti Osztályán végezték (**1. és 2. cikkek**).

Az örökletes angioneurotikus oedemában (HANO) szenvedő betegek és családtagjaik részletes kivizsgálása és gondozása országos ellátási területtel a Semmelweis Egyetem Kútvölgyi Klinikai Tömb Orr-Fül-Gégészeti és Allergológiai Ambulanciáján történt. A genetikai vizsgálatok szempontjából kiemelkedő fontosságú komplement vizsgálatok a SE

III. Belklinika Kutató Laboratóriumában történtek. Az értekezés beadásakor 26, egymással rokoni kapcsolatban nem álló, HANO-ban szenvedő családból (23 HANO-I és 3 HANO-II) 64 beteg (30 férfi és 34 nő), és 29 egészséges hozzátartozó anyagát tároltuk. A betegek és az érintett családtagok a szóbeli tájékoztatást követően írásbeli, tájékoztatáson alapuló beleegyező nyilatkozatot írtak alá (**3. cikk**).

A fiatalkori hemokromatózisban szenvedő beteg és családtagjai klinikai és laboratóriumi kivizsgálását a Fővárosi Szent János Kórház III. Belgyógyászati Osztályán végezték. A szívbiopsziás minta szövettani vizsgálatát a Szent János Kórház Patológiai Osztályán és a SE Igazságügyi Orvostani Intézetében végezték (**5. cikk**).

A populációgenetikai vizsgálatokhoz használt első kontroll csoport (277 személy) egymással rokoni kapcsolatban nem álló, egészséges intézeti dolgozókból, csontvelődonorokból és apasági vizsgálatok résztvevőiből állt túlnyomórészt Budapestről és vonzáskörzetéből (**6. és 10. cikkek**).

Hemokromatózis klinikai gyanúja miatt a dolgozat készítéséig 464 személynél (181 nő, 283 férfi) kértek diagnosztikai célú C282Y mutáció analízist az ország egész területéről. A H63D vizsgálatát csak a C282Y-heterozigótáknál végeztük el. A legtöbb esetben részletes klinikai adatok nem álltak rendelkezésünkre, a vizsgálat elvégzésének okaként általában az emelkedett szérum vas ill. ferritin szintet és csökkent teljes vaskötő kapacitást jelölték meg. Gyakran ismert, másodlagosan vaslerakódáshoz vezető faktorok mellett (alkoholfogyasztás, vírusos hepatitis, többszörös transzfúziók stb.) az öröklődő haemochromatosis társulásának kizárása volt a vizsgálat célja. Az azonosított C282Y-homozigóta, és a C282Y/H63D kettős heterozigóta egyének klinikai adatait retrospektíven dolgoztuk fel (**7. cikk**).

A populációs HFE C282Y-szűréshez használt második, nagyobb létszámú reprezentatív csoportunk 996 egészséges, önkéntes véradóból (362 nő, 634 férfi) állt. A véradók

bevonását a vizsgálatba a budapesti Országos Vérellátó Szolgálat (OVSZ) és az OVSZ Szegedi Tudományegyetemen működő Regionális Vérellátója végezte. A véletlenszerű mintavétel lehető legjobb megközelítése érdekében törekedtünk a konszekutív mintavételre. Szóbeli tájékoztatást követően a véradók írásbeli, tájékoztatáson alapuló beleegyező nyilatkozatot írtak alá. A HFE C282Y mutáció-kimutatás pozitív eredményéről írásos értesítést kaptak azok a véradók, akik ezt igényelték. 694 budapesti és 302 szegedi véradót vizsgáltunk, az átlagéletkor férfiaknál 35,7 év, nőknél pedig 37,0 év volt (tartomány: 18-65 év). A korábbi véradások száma a nőknél átlagosan 14,0 férfiaknál pedig 18,4 (tartomány: 0-95) volt. A C282Y mutáció analízist minden véradónál, a H63D mutáció analízist a C282Y-heterozigótáknál, 80 első véradónál és 80-80 közepes számú (6-13 korábbi véradás) ill. sokszoros (30-95 korábbi véradás) véradónál végeztük el (**8. cikk**).

A myelodyspláziában szenvedő betegeknél (32 nő, 18 férfi; átlagéletkor a betegség diagnózisakor: 70,3 év, tartomány: 37-87 év) a C282Y és a H63D mutáció előfordulási gyakoriságát egyaránt vizsgáltuk. A betegek megoszlása a betegség-alcsoport szerint akövetkező volt: 26 RA-ban (refrakter anaemia), 9 RARS-ban (RA gyűrűs sideroblastokkal), 2 RAEB-ban (RA blast túlsúllyal) és 13 beteg RAEBt-ben (RAEB transzformációval) szenvedett (**9. cikk**).

II. 2. MÓDSZEREK

II.2.1. DNS-izolálás

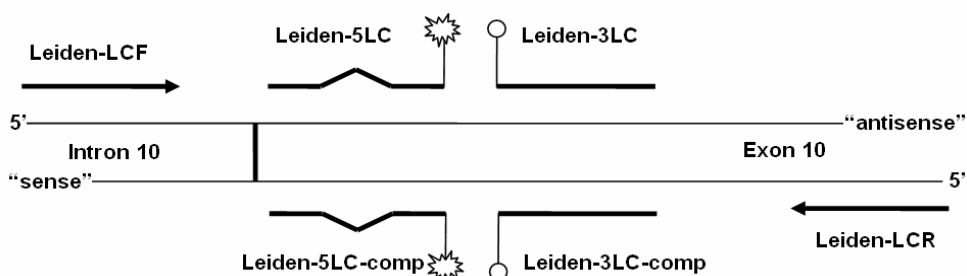
A genomiális DNS-t frissen levett vagy a -20°C-on tárolt, elsősorban EDTA-val alvadásgátolt, perifériás vérmintából vagy prenatális vizsgálatnál CVS-mintából izoláltuk. 1995-2000 között a „kisózásos” módszert alkalmaztuk (Miller 1988). A módszer lényege, hogy hipozmotikus lízissel végzett vörösvérsejt-mentesítést követően a magvas sejtek maradványát proteináz K-val emésztjük, majd a megemésztett fehérjéket nagy

koncentrációjú NaCl oldattal, ezt követően a DNS-t etanollal csapjuk ki. A módszer munka- és idő-igényesebb, mint az újabb, gyári kiteket alkalmazó eljárások, de lényegesen olcsóbb azoknál. A mintaszám bővülésekor (2000-ben) áttértünk a gyári reagensek (Puregene™ DNA Isolation Kit, Blood Kit; Gentra Systems) rutinszerű alkalmazására. A DNS oldatot -20°C-on tároltuk.

II.2.2. Primer tervezés

A bemutatott munkák túlnyomó többségénél saját tervezésű oligonukleotid primereket használtunk. A tervezéshez a leggyakrabban a szabadon hozzáférhető, Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) programot használtuk (Rozen & Skaletsky 2000). A fluoreszcens jelölésű hibridizációs oligonukleotidokat a LightCycler készülék (Roche) beépített programjával terveztük. A megtervezett oligonukleotidokat az Integrated DNA Technologies (IDT) cég internetes ellenőrző programjával ellenőriztük. Valamennyi felhasznált oligonukleotid bázissorrendjének megadása meghaladná a jelen dolgozat kereteit, így utalok a függelékben található teljes terjedelmű közleményekre és az azokban megadott hivatkozásokra.

Az valós idejű PCR-rel végzett genotipizálás körülményeinek vizsgálata során (**11. cikk**) a *FV Leiden* mutáció kimutatási rendszerhez az 1. ábra sémáján feltüntetett nem jelölt (amplifikációs), illetve jelölt (hibridizációs) oligonukleotidokat használtuk.



1. ábra A *FV Leiden* mutáció kimutatási rendszerben a valós idejű PCR-es genotipizáláshoz felhasznált jelölt és nem jelölt oligonukleotidok elhelyezkedése a *FV* génen. A részletes magyarázatot lásd a III.2.4. alfejezetben.

II.2.3. Polimeráz láncreakció (PCR)

A projektek többségében a DNS-analízis kiindulópontja a polimeráz láncreakció (PCR) útján végzett amplifikáció, amelyet standard módon az adott szekvenciára specifikus, szintetikus oligonukleotid primerek, Taq polimeráz, dNTP, megfelelő puffer és genomiális DNS-templát jelenlétében végeztünk. A PCR program három fontos hőmérséklet - a 95°C-os denaturálás (a kettős szálú DNS-templát egyszálúvá alakítása), az 50-65°C közötti anelláció (primer-kitapadás: a konkrét hőmérséklet az aktuális primer szekvencia függvénye), és 72°C-os lánchosszabbítás (elongáció) – ciklikus, általában 30 alkalommal ismételt változtatását jelentette. A PCR-termék analízise horizontális gél-elektroforézissel, etidium bromidos festéssel és UV-megvilágítással történt. Mutációk és/vagy polimorfizmusok kimutatása céljából az elektroforézist megelőzően több esetben emésztettük a PCR terméket restrikciós endonukleázokkal (PCR-RFLP). A 11 saját közlemény közül (V.1. alfejezet) mindössze kettőben (a **4.** és a **11. cikkek**) nem alkalmaztunk hagyományos PCR-technikát. A további részleteket a függelékben található közlemények tartalmazzák.

II.2.4. Genotipizálás valós idejű PCR-rel

Az új valós idejű PCR-készülék, a LightCycler (Roche) intézeti beszerzését követően számos mutáció-kimutatói technikát állítottunk át a valós idejű PCR és olvadáspont-elemzéssel megvalósuló genotipizálásra. Az eljárás lényege, hogy jelöletlen amplifikációs primerekkel végzett PCR-reakciót követően hibridizációt és olvadáspont elemzést végzünk két másik oligonukleotid (szonda) segítségével. A PCR-készülék és fluoriméter kombinációjának tekinthető LightCycler a PCR-reakció és az olvadáspont-analízis során folyamatosan regisztrálja a minták aktuális fluoreszcenciáját. Ez teszi lehetővé a PCR-termék keletkezésének valós idejű követését, ami a mennyiségi nukleinsav-technikák alapja, valamint a fluoreszcencia-változások mérését az aktuális mintahőmérséklet

függvényében az olvadáspont-elemzés során. Mindehhez különleges optikai tulajdonságú kvarcüvegből készült kapillárisokra van szükség. A genotipizálás alapja, hogy a fluoreszcens jelölést tartalmazó hibridizációs oligonukleotidok eltérően hibridizálnak a vad típusú, illetve egy bázis eltérést tartalmazó variáns DNS-szakaszokkal, és ez nagy biztonsággal és érzékenységgel kimutatható a LightCyclerrel végzett olvadáspont-elemzés során. A további részleteket a III.2.4. alfejezet és a **11. cikk** tartalmazza.

II.2.5. Mikroszatellita-elemzés

A HA és HB genetikai vizsgálatai részeként az indirekt családvizsgálatok során polimorf DNS-markereket illető különbségeket keresünk az érintett és családtagjai között. A polimorf mintázatok kimutatására a bi-allélikus markerek esetében gyakran alkalmazott PCR-RFLP technika mellett mikroszatellita-elemzéseket használunk. Kezdetben radioaktív primer-jelölést, különleges, igen vékony, nagy felbontású akrilamid gél-elektroforézist, és autoradiográfiát alkalmaztunk (**1. cikk**). Az utóbbi két évben volt lehetőségünk erről a munka- és idő-igényes módszerről áttérni a fluoreszcens primer-jelöléssel és automata kapilláris elektroforézissel (ABI 310) végzett mikroszatellita-elemzésre.

II.2.6. Southern blotting

A *FVIII* (III.1.1. alfejezet), illetve a *C1-INH* (III.1.2. alfejezet), gének nagyméretű szerkezeti eltéréseit Southern blotting technikával vizsgáltuk. A módszer lényege, hogy egy adott restrikciós endonukleázzal (esetünkben a *BclI*-gyel) viszonylag nagy mennyiségű genomiális DNS-t emésztünk. Az emésztett (feldarabolt) genomiális DNS-t agaróz gél-elektroforézissel választjuk el méret szerint. Az egyes fragmentumok mérete az adott restrikciós enzim hasítási helyeinek egymástól való távolságától függ. Az emésztett DNS-darabokat a futási sorrendet megőrizve passzív diffúzióval membránra vesszük át (blottoljuk), hőkezeléssel rögzítjük, és a membránhoz rögzített DNS fragmentumokat hibridizáltatjuk egy olyan szondával (DNS-darab, probe), amely a vizsgálni kívánt

szakaszra (esetünkben az *FVIII* génnel kapcsolt intronikus és extragenikus *F8A* génekre, illetve a teljes *CI-INH* génre) specifikus. A szonda radioaktív izotóppal jelölt, így a kérdéses régiót tartalmazó DNS fragmentumok autoradiográfiásan megjeleníthetőek, méretük meghatározható. Minden esetben empirikus mintázatokat hasonlítunk össze, azaz egy kontroll (vad típusú) és egy azzal azonos, illetve attól eltérő mintázathoz vonunk le következtetéseket. Megfelelő restriktációs endonukleáz és szonda kiválasztásával a módszer alkalmas nagyméretű génátrendeződések (pl. deléciók, inszerciók vagy inverziók) kimutatására (**2. és 3. cikkek**).

II.2.7. Hosszú PCR

A *FVIII* gén 22. intron inverziója kimutatása során alternatív módszerként hosszú (long distance) PCR módszert használtunk (Liu 1998). Az eljárás lényege, hogy a *FVIII* gén intronikus és extragenikus *F8A* homológ régiói teljes hosszát és a környező szekvenciákat különleges PCR-technikával amplifikáljuk a homológ régió kívüli elhelyezkedő primer párokkal. A kapott PCR termékek mérete eltér a vad típusú intra- és extragenikus homológ régiók és az inverzióban résztvevő homológ régiók esetén. A módszer különlegességét a megcélzott PCR-termékek mérete jelenti, amely a 10-12 kb tartományban van, szemben a szokásos 0,5-1 kb méretű PCR termékekkel. A szokatlanul nagy PCR-termék "legyártása" érdekében és a *FVIII* gén érintett régiójának viszonylagos (akár 70%-ot is elérő) GC-gazdagsága miatt megváltoztatjuk az alkalmazott DNS polimerázt (különböző 5'→3' és 3'→5' exonukleáz aktivitású DNS polimerázok megfelelő arányú keveréke), más PCR ciklus-időket (a lánchosszabbítás ideje 1 perc kilobázisonként) alkalmazunk, továbbá magas DMSO, *Taq* és *Pwo* polimeráz koncentrációjú, illetve 50% deaza-dGTP-tartalmú reakció-elegyet használunk (**2. cikk**).

II.2.8. Közvetlen szekvencia-elemzés

A Sanger-féle didezoxi láncterminációs technikát alkalmaztuk, kezdetben radioaktív didezoxi nukleotid-jelöléssel és nagy felbontású akrilamid elektroforézissel, majd fluoreszcens didezoxi nukleotid-jelöléssel és kapilláris elektroforézissel. A módszer lényege, hogy a szekvenáló reakcióban az egyik primerrel elindított lánchosszabbítás során a DNS-polimeráz véletlenszerűen épít be kémiaiilag módosított didezoxi-nukleotidokat, illetve módosítás nélküli nukleotidokat a komplementaritás elve alapján meghatározott pozíciókba. Ha didezoxi-nukleotid épül be, a további lánchosszabbítás nem lehetséges (lánctermináció). Így a reakció végén egy olyan szintetikus DNS-fragmentum keveréket kapunk, amely egy bizonyos mérettartományon belül valamennyi lehetséges hosszúságú DNS-darabot tartalmazza, mindegyik végén egy-egy jelölt, abba a pozícióba illő didezoxi-nukleotiddal. Ezután nagy felbontású gél-elektroforézissel méret szerint el kell választanunk a fragmentumokat és radioizotópos jelölésnél az autoradiográfiás képről, fluoreszcens jelölésnél pedig a fluoriméter által detektált szignálból generált szinkód alapján le kell olvasnunk az eredményt.

Első lépésként egyszerű PCR-amplifikációt végeztünk a kívánt génszakaszról. Az ezután következő szekvenáló reakcióban a tisztított PCR-termék (templát) mellett az egyik amplifikációs primert, jelölt didezoxi-nukleotidokat, nem jelölt nukleotidokat, DNS-polimerázt és puffert használtunk. Az eredeti technika során négy külön reakciócsőben radioizotóppal jelölt didezoxi-nukleotidokat alkalmaztunk, nagy felbontású (szekvenáló) akrilamid gél-elektroforézist, és autoradiográfiát végeztünk. A teljes automatizálást is lehetővé tevő új fejlesztést a négy különböző fluoreszcens festékkel jelölt didezoxi-nukleotidok egy csőben történő alkalmazása és az automatizált kapilláris elektroforézissel végzett méret szerinti elválasztás jelentette. Ehhez a módszerhez a BigDye Terminator cycle sequencing kittet és egy újonnan beszerezett ABI 310 genetikai analizátort

használtunk. Az adatelemzéshez a genetikai analízátor saját számítógépes programját használtuk. Eltérés vagy nem egyértelmű szekvencia esetén elvégeztük a fordított irányú, azaz az ellentétes primerrel végzett szekvenálást is (III.1.1., III.1.2., III.1.3. alfejezetek, **3. és 5. cikkek**).

II.2.9. Statisztikai módszerek

A statisztikai módszerek közül a mutációk/variánsok előfordulási gyakoriságainak összehasonlításához allél-frekvencia (a mutációt tartalmazó kromoszómák aránya az összes vizsgált kromoszómához képest) értékeket, 95%-os megbízhatósági tartományt (95% CI) és kockázati hányados (odds ratio, OR) értékeket számítottunk. Az értékeket a khi-négyzet próbával vagy Fischer-féle exact teszttel hasonlítottuk össze. A folyamatos változók értékeit átlag \pm SD-ként tüntettük fel, összehasonlításukat pedig kétmintás t-próbával végeztük. A szignifikancia-határ $p < 0,05$ volt minden vizsgálatnál.

III. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

III.1. MONOGÉNES HEMATOLÓGIAI/IMMUNOLÓGIAI KÓRKÉPEK

III.1.1. Hemofília

Ebben a fejezetben az A típusú hemofiliával (HA) kapcsolatos eredményeinket foglalom össze nagyobb terjedelemben, és a fejezet második felében kisebb terjedelemben számolok be a B típusú hemofiliával (HB) kapcsolatos eredményekről.

A haemophilia A (HA) X kromoszómához kötött, recesszív módon öröklődő vérzékenység, amely minden 5000-10 000-dik fiúgyermeket érint. Magyarországon mintegy 900 HA-beteget tartanak nyilván. A kórképet a VIII. véralvadási faktor csökkent, illetve hiányzó aktivitása okozza. Az elhúzódó vérzések, az izületek és az izmok bevérzésének súlyossága a beteg maradék VIII. faktor aktivitásától függ és különböző

mértékben, esetenként jelentősen csökkenti az élettartamot és rontja az életminőséget. A betegség diagnózisa az érintett betegeknél fenotípusos vizsgálatokkal biztonsággal felállítható. A tünetmentes hordozók azonosítása és a hordozók fiúmagzatainál a betegség születés előtti kimutatása molekuláris genetikai vizsgálatokkal oldható meg.

A HA során észlelhető klinikai tünetek súlyossága a keringésben található VIII. faktor mennyiségétől, illetve aktivitásától függ. Súlyos esetben, amikor a VIII. faktor aktivitása alacsonyabb, mint a normál aktivitás 1%-a, a kisebb traumát követő, illetve a spontán bekövetkező ízületi és izomközi vérzések kialakulása a legjellemzőbb tünet. 1-5%-os VIII. faktorszint esetén (középsúlyos eset) a spontán vérzések előfordulása ritkább, kisebb sérülések után lépnek fel elhúzódó vérzések. Enyhe esetekben (VIII. faktorszint 5-30%) elhúzódó vérzés csak foghúzás, fogászati illetve sebészeti beavatkozás, vagy nagyobb sérülések után fordul elő.

A vérzések során leggyakrabban a könyök-, a térd-, a boka- és a csípőízület érintett. Faktorpótlás nélkül az ízületi intrakapszuláris vérzés komoly duzzanatot, fájdalmat és ízületi merevséget okoz. A vér irritálja a synoviumot, amely gyulladásához, proliferációhoz, degeneratív arthritis kialakulásához vezet. Izomvérzés bárhol előfordulhat, főként a nagy igénybevételnek kitett helyeken (pl. comb, lábikra és farizomzat). A haematuria nem gyakori, de szinte minden súlyos betegnél előfordul egyszer-kétszer az élete során. Központi idegrendszeri vérzés általában csak fejsérüléskor következik be. Korábban ez okozta a legtöbb halálesetet a hemofiliás betegek között. Műtéteknél nemcsak a vérvesztés, hanem a vérzés elhúzódása is gondot okoz (Peake 1998; Kazazian 1995; Roberts 1995).

Mivel a VIII. faktor fehérje nem jut át a placentán, ezért a vérzékenység már újszülött korban jelentkezhet. Gyakoriak az injekciók utáni hematomák, vagy a circumcisiót követő vérzések. Születéskor cephalhematoma, illetve hosszantartó köldökvérzés is előfordulhat.

Számos érintett újszülöttnél azonban nincsenek klinikai tünetei. Amint a gyermekek járnival tanulnak, kiterjedt zúzódások jelentkeznek. Az ajak és a nyelv egyébként kicsiny sérülése, amely órákig vagy napokig is vérzik, vezet el leggyakrabban a diagnózishoz. A betegség súlyos formájában szenvedők 90%-ánál 1 éves korra a vérzékenység klinikailag már nyilvánvalóvá válik (Nelson 1995). A kórkép kezelésének fő eleme a különböző technológiákkal előállított, rendszeres VIII. faktor fehérje pótlás. Az oki kezelést a génterápia jelenthetné, amely azonban még távol áll a rutinszerű alkalmazástól.

A HA patomechanizmusa napjainkra részleteiben is ismertté vált. A csökkent VIII. alvadási faktor aktivitás következtében a koagulációs rendszer plazmában található, enzimatisz véralvadási reakció-láncolata elégtelenül működik. A csökkent VIII. faktor funkció miatt elsődlegesen lassul a IXa faktor által katalizált X. – Xa faktor átalakulás (Machovich 2001; Bolton-Maggs 2003). A vérzékenység az egyik legrégebben ismert örökletes megbetegedésnek tekinthető, hiszen már az ókorban is ismerték, a klinikailag igen hasonló HA és HB elkülönítése azonban csak 1952-ben történt meg (Kazazian 1995). A VIII. faktor fehérje tisztítására irányuló ám sokáig eredménytelen kísérletek az 1950-es években kezdődtek. A VIII. faktor fehérje tisztán nehezen izolálható, mivel a von Willebrand faktorhoz (vWF) kötődik, önmagában alacsony koncentrációban van jelen és instabil. A VIII. faktor fehérje tiszta előállítása először 1979-ben sikerült. Elegendő mennyiségű FVIII izolálása után részleges fehérje szekvencia meghatározással funkcionális klónozással lehetőség nyílt a VIII. faktor gén (*FVIII*) azonosítására (Kazazian 1995, Gitschier 1984).

A *FVIII* gén az X kromoszóma hosszú karjának disztális végéhez közel, 1 megabázisra a telomertől (a kromoszóma vége), az Xq28 régióban található. A 186 kilobázisos méretével (26 exon) az egyik leghosszabb emberi gén (Gitschier 1984). A génről 9 kilobázis nagyságú mRNS íródik át, amelyről egy 2351 aminosavból álló fehérje

szintetizálódik. Igen jelentősek a FVIII fehérje poszttranszlációs módosulásai, amelynek részeként az endoplazmatikus retikulumba kerüléskor az N-terminális 19 aminosav lehasad és az aszparagin aminosavak oldalláncaihoz oligoszacharidok kapcsolódnak. A Golgi rendszerben kihasad a B domén egy része, a szerin és a treonin aminosav oldalláncokhoz szénhidrátok kötődnek és a hat tirozin oldallánc szulfatálódik. Alapállapotban a FVIII. fehérje a plazmában egy 90-200 kDa-os nehéz láncból, és egy 80 kDa-os könnyű láncból áll, amelyet a vWF stabilizál (Kazazian 1995).

A HA nemhez kötött recesszív öröklésmenetű, így a betegség néhány ritka kivételtől eltekintve férfiaknál alakul ki. Az X-hez kötött öröklésmenetből adódóan egy beteg apának valamennyi fia egészséges, viszont valamennyi lánya hordozó (carrier) lesz. Obligát hordozónak tekinthető (i) egy hemofiliás férfi lánya, (ii) az anya, akinek legalább két beteg fia van (akik nem egyetétjű ikrek) vagy akinek egy beteg fia és egy olyan lánya van, aki HA-ban szenvedő fiút szült, és (iii) az anya, akinek egy hemofiliás fia van, de családjában anyai oldalon más HA-ban szenvedő beteg is van. A hordozók lányai az esetek felében szintén hordozók, míg fiai az esetek felében betegek lesznek. Potenciális hordozónak tekintjük azokat a nőket, akiknek az anyja hordozó, de ők maguk nem obligát hordozók (Peake 1993).

A hordozók az esetek túlnyomó többségében tünetmentesek, faktor-szintjük átlagosan a normál FVIII aktivitás 50%-a, azonban nagy az átfedés a obligát hordozók és az egészséges nők faktor-aktivitása között. Az embrionális fejlődés során a nőknél a két X kromoszóma közül az egyik véletlenszerűen inaktiválódik a sejtekben (lyonizáció). Előfordulhat, hogy a FVIII-t termelő sejtekben főként a mutációt hordozó X kromoszóma inaktiválódott, és így normál mennyiségű VIII. faktor képződik (Miller 1989). Ennek ellentétéképpen olyan eset is ismert, amikor főként az egészséges X kromoszóma inaktiválódik és a hordozó nőnél HA alakul ki. A potenciális hordozók vizsgálatokor talált

alacsony FVIII aktivitás (<50%) a hordozói állapotot valószínűsíti, a normál 70-150%-os FVIII aktivitás viszont nem zárja ki a hordozó státuszt. A faktor-szint normál esetben is változik (pl. az életkorral növekszik) és szintjét bizonyos gyógyszerek (pl. ösztrogéntartalmú fogamzásgátló tabletták), illetve a terhesség jelentősen befolyásolják. Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a hordozói státusz kimutatására a fenotípus vizsgálatok gyakran nem megbízhatóak, így a molekuláris vizsgálatok szerepe igen jelentős.

HA-ban a genetikai diagnosztika célja egyrészt a hordozók azonosítása (carrier-diagnosztika), valamint az azonosított hordozóknál igény esetén a prenatális (születés előtti) diagnosztika biztosítása. A prenatális diagnosztika magában foglalja mindazokat a vizsgálatokat, amelyek segítségével az embrió vagy a magzat állapotáról a terhesség során felvilágosítást nyerhetünk. Napjainkban leginkább a terhesség 16. hetében végzett magzatvíz vétel (amniocentesis, AC), vagy a terhesség 8-12. hetében végzett chorion boholy mintavétel (chorionic villus sampling CVS) terjedt el, amelyekkel magzati eredetű sejteket nyerhetünk citogenetikai és molekuláris genetikai vizsgálatra. Bár mindkét magzati mintavételi technika invazív, alkalmazásukkor a vetélések kockázata 1% alatt van.

Ideális esetben a potenciális vagy az obligát hordozók korán, még terhességük előtt felkeresik a genetikai tanácsadást, és a genetikai laboratórium kimutatja a beteg családtagban a betegségért felelős mutációt vagy azonosítja a prenatális diagnosztikára alkalmas polimorf markert. Potenciális hordozóknál a vizsgálatok akár ki is zárhatják a hordozói státuszt, így elkerülhető az invazív prenatális vizsgálat. Az azonosított hordozóknál prenatális diagnózis igénye esetén chorion boholy mintavétellel akár a terhesség 8-10. hetes korában megtörténhet a magzati sex-kromoszóma meghatározás és fiú magzat esetén a genetikai vizsgálat is egy-két héten belül elvégezhető.

A szélsőségesen nagy méretű FVIII génen napjainkig mindössze két gyakrabban ismétlődő mutációs mechanizmust írtak le. Az egyik, a súlyos HA-betegek (a FVIII

Programunk során olyan indirekt markerek beállítását végeztük el, amelyek kombinációjával a magyar HA-családok több, mint 95%-ban biztonsággal tudunk hordozó és prenatális diagnosztikát biztosítani (1. táblázat). A markerek kiválasztásánál elsődleges szempont volt a magas informativitási arány, és a markerek kapcsoltságának elkerülése. Az intragenikus markerek alkalmazását előnyben részesítettük az extragenikus markerek alkalmazásához képest, mivel az intragenikus markereknél kisebb a marker és a betegségért felelős kóroki mutáció között bekövetkező rekombináció esélye (Peake 1993).

1. táblázat A FVIII génnel kapcsolt, általunk használt indirekt markerek néhány jellemzője

Marker	Lokalizáció	Allélek száma	Módszer	Informativitás	Hivatkozás
IVS13CA	13. intron	8	PCR-PAGE	34-91%	Lalloz (1991)
<i>Bcl</i> I	18. intron	2	Southern blot PCR-RFLP	31-49%	Peake (1993)
p39CA	Extragenikus, mintegy 500 kb-ra a HA géntől	8	PCR-PAGE	84%	Wehnert (1993)

A markerek informativitási aránya a heterozigóták arányának felel meg, amely egyes populációkban eltér.

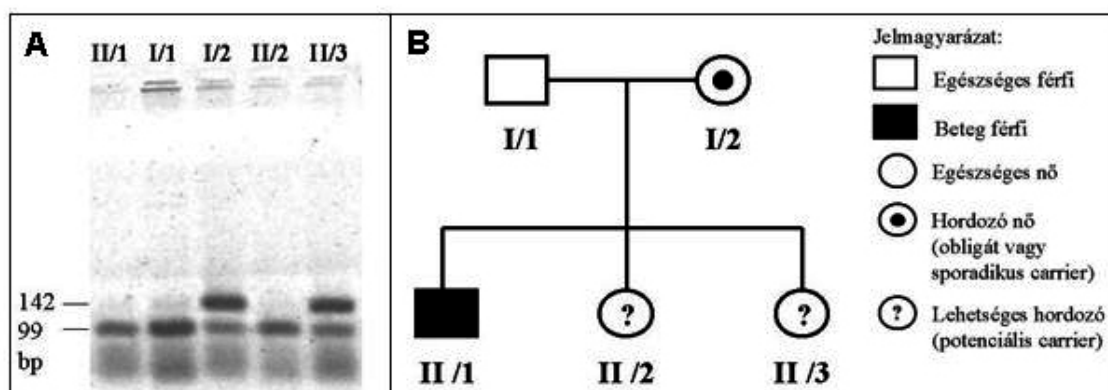
Az indirekt elemzések közül először a *Bcl*I PCR-RFLP vizsgálatát végezzük el. A *Bcl*I polimorfizmus a FVIII gén 18. intronjában található pontmutáció. Kétféle allélje lehetséges (bi-allélikus), az egyik tartalmazza a *Bcl*I restrikciós enzim hasítási helyet, a másik nem. A mikroszatellita elemzések a PCR-RFLP vizsgálatoknál informatívabbak (mivel multi-allélikusak), viszont a vizsgálat kivitelezése idő- és költség-igényesebb, valamint radioaktív izotóp, illetve fluoreszcens jelölésű reagensek felhasználását igényli. Amennyiben a *Bcl*I PCR-RFLP vizsgálat nem informatív, az intragenikus IVS13CA mikroszatellita elemzést végezzük el. Ez a mikroszatellita a gén 13. intronjában található dinukleotid (CA) „repeat” (ismétlődés). nyolc allélikus variációja ismert, de az allélok

eloszlása nem egyenletes, a leggyakoribb allélok frekvenciája 45 illetve 30%. Ez csökkenti annak az esélyét, hogy a marker heterozigóta, azaz informatív legyen egy konkrét esetben.

Ellentétben a direkt mutáció kimutatással, amely egyértelmű diagnózishoz vezet, az indirekt elemzéssel nyerhető információ mindig valószínűség jellegű, hiszen az addig egy kromoszómán öröklődő marker és mutáció rekombináció útján különböző kromoszómára kerülhetnek. Ez az esély azonban a két FVIII. génen belüli markernél a teljes genomra számított átlagos crossing over (rekombináció) gyakoriságot figyelembe véve kevesebb, mint 0,2% (Strachan 1996). Bár a leginformatívabb marker a p39CA (a 8 lehetséges alléljából 5 allél-frekvenciája 21% és 12% között van, tehát egyenletes az eloszlása), mégis ezt a polimorfizmust elemezzük utoljára, mivel a FVIII génen kívül helyezkedik el, így a rekombináció valószínűsége a marker és a mutáció között nagyobb, bár még mindig kevesebb, mint 0,7% (**1. cikk**).

A diagnosztikai algoritmus keretében a két leggyakrabban alkalmazott, különböző típusú indirekt marker elemzés eredményeinek értékelését két kiválasztott család példáján mutatom be.

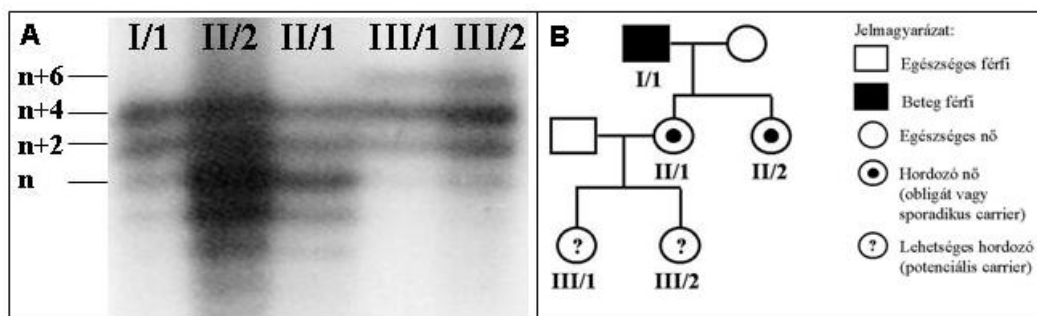
Az 1. család esetében (3/B ábra) a HA-ban szenvedő férfi leánytestvéreinél kellett eldöntenünk, hogy hordozzák-e a betegségért felelős gént. Mindkét leánytestvér a közeljövőben gyermeket szeretne vállalni. A plazma FVIII aktivitása mind a leánytestvéreknél mind az édesanyjuknál meghaladta az 50%-os értéket, így a fenotípusos vizsgálatokkal a hordozói állapotra nem következtethettünk. A családfa-adatok alapján az anya obligát hordozó (azaz a családjában más HA-ban szenvedő, a családfán nem szereplő beteg is található), így a leányai 50-50% eséllyel hordozók, illetve nem hordozók.



3. ábra: Családvizsgálat *BclI*-PCR-RFLP elemzéssel (1. család). **A panel:** Az emésztett PCR termékek agaróz gél-elektroforézise után kapott gél képe; **B panel:** Családfa és a hozzá tartozó jelmagyarázat.

A 3/A ábrán látható, hogy a betegség génje a *BclI* emésztett (99 bp hosszúságú) alléljával kapcsolt, mert ezt az allélt hordozza a HA-ban szenvedő beteg családtag (II/1). Az édesanyja (I/2) heterozigóta, a 144 és 99 bp-os allélt egyaránt hordozza. A anya betegséget hordozó X kromoszómáján az emésztett allél (99 bp), az egészséges X kromoszómáján az emésztetlen allél (144 bp) található, tehát esetében ez a *BclI* marker informatívnak tekinthető. Az egészséges édesapa (I/1) szintén az emésztett allélt hordozza, de az ő X kromoszómája nem hordozza a betegséget. A II/3 jelzésű leány heterozigóta a *BclI* allélra nézve. Édesapjától csak az emésztett (egészséges) allélt örökölhette, édesanyjától tehát az emésztetlen allélt, azaz a szintén egészséges X kromoszómát kapta. A molekuláris genetikai vizsgálatok szerint tehát a II/3 lánytestvér nem hordozza a HA betegséget. A II/2 jelzésű leány homozigóta a *BclI* allélra nézve, mind az édesapjától, mind az édesanyjától az emésztett allélt kapta. Mivel tudjuk, hogy édesanyjánál az emésztett allél hordozza a betegséget, így nála a molekuláris genetikai vizsgálattal megállapítottuk, hogy hordozza a betegség génjét. Mivel a II/2 jelzésű leány homozigóta a *BclI* markerra nézve, így ezzel a markerral az esetleges fiúmagzatánál majd nem tudjuk eldönteni, hogy a betegséget hordozó X kromoszómát örökölte-e vagy sem (azaz a II/2 jelzésű leánynál a *BclI* marker nem informatív); így a családban további indirekt markerek vizsgálatára volt szükség.

A mikroszatellita-elemzés során egy rövid szekvencia szakasz különböző számú ismétlődését (pl. di-, tri- vagy tetranukleotid „repeat”-ek) hasonlítjuk össze.



4. ábra: Családvizsgálat IVS13CA mikroszatellita elemzéssel (2. család). **A panel:** a radioaktívan jelölt PCR termékek poliakrilamid gél-elektroforézise után a gélről készült autoradiogram képe; **B panel:** Családfa és a hozzá tartozó jelmagyarázat.

A 2. családban (4/B ábra) az I/1 jelzésű, HA-ban szenvedő férfi leányai biztosan hordozók, leányunokáinak (III/1 és 2) 50% az esélye, hogy hordozók legyenek. Ha találunk a II/1 jelzésű obligát hordozónál informatív markert, úgy 99%-os biztonsággal eldönthető, hogy az unokáknál megtalálható-e a betegség génje vagy sem. A *BclI* marker a II/1 jelzésű hordozónál nem volt informatív, így mikroszatellita elemzést (IVS13CA) végeztünk. A betegség okozó mutáció az „n+4”-es allélhoz kapcsolt, ez látható a beteg férfi (I/1) esetében. Leányai (II/1 és II/2) heterozigóták, az „n” és „n+4” allélekre, amelyből az „n+4” kapcsolt a betegséget hordozó, mutáns FVIII génnel. Unokái (III/1 és III/2) a mutációval kapcsolt „n+4”-es allélt az anyjuktól, az „n+6”-os allélt apjuktól örökölték. Tehát ők is hordozók (99,9% eséllyel), és a marker náluk is informatív, prenatális vizsgálatra felhasználható.

Diagnosztikai stratégiánkkal (a direkt és az indirekt módszerek kombinációjával) 88 család molekuláris genetikai vizsgálata során 54 potenciálisan hordozó nőnél kizártuk a hordozói státusz lehetőségét, és 28 nőnél megerősítettük a hordozói státuszt (diagnosztizált hordozók). 129 (28 diagnosztizált, 76 családfaadatok alapján obligát és 25 sporadikus) hordozó esetében azonosítottuk a FVIII géninverzió jelenlétét vagy találtunk legalább egy informatív markert, amellyel terhesség esetén prenatális diagnosztika végezhető, illetve az

idősebb hordozók leányainál eldönthető, hogy hordozzák-e a betegségért felelős X kromoszómát. Egy reprodukív korban levő diagnosztizált hordozónál mindhárom marker homozigótának bizonyult, így ebben az esetben terhesség esetén fiú magzatnál a jelenlegi módszerekkel nem tudjuk majd eldönteni, hogy beteg lesz-e. Az alkalmazott diagnosztikai stratégia tehát 129/130 hordozónál (99,2 %) bizonyult informatívnak. A különböző markerekkel végzett vizsgálatok valamennyi esetben alátámasztották egymást. Az elemzett családokban a markerek között rekombinációt nem észleltünk.

A három marker (*BclI*, IVS13CA, p39CA) elméletileg kiszámított kombinált informativitási aránya 94,3% az inverzió negatív családokban, amely 97,3%-ra emelkedik a súlyos HA-betegek családjaiban az inverzió kimutatás alkalmazásának figyelembe vételével. Vizsgálataink során, amennyiben eltekintünk a genetikai tanácsadáson hiányosan résztvevő családoktól, a kombinált informativitási arány 99,2 % volt. Ez arra utal, hogy a kiválasztott három marker nem öröklődik kapcsolatosan. Egymást követő alkalmazásuk (és kombinációjuk az inverzió kimutatással a súlyos HA-családokban) egy megbízható, gyors és költségkímélő kivizsgálási algoritmust jelent a HA hordozó- és prenatális diagnosztikájában a magyar populációban (**1. cikk**). A beállított módszerek lehetővé teszik, hogy egy korábban nem vizsgált család esetében is (prenatális vizsgálat igénye esetén) néhány héten belül eredményt adjunk.

Prenatális diagnosztikát csak fiú magzatok esetében végeztünk. A programunk során vizsgált 27 magzatból 14 volt fiú. A fiú magzatok közül molekuláris genetikai vizsgálattal hét bizonyult egészségesnek és hat betegnek. Egy esetben a HA-ban szenvedő beteg nem volt vizsgálható, és az obligát hordozó leányánál nem lehetett megállapítani, hogy melyik X kromoszóma hordozza a betegséget, így fiú magzatánál prenatális diagnózist nem tudtunk adni. A molekuláris genetikai vizsgálattal egészségesnek talált, utólagosan információt szolgáltató négy esetben a betegség mentes állapot fenotípus vizsgálattal is

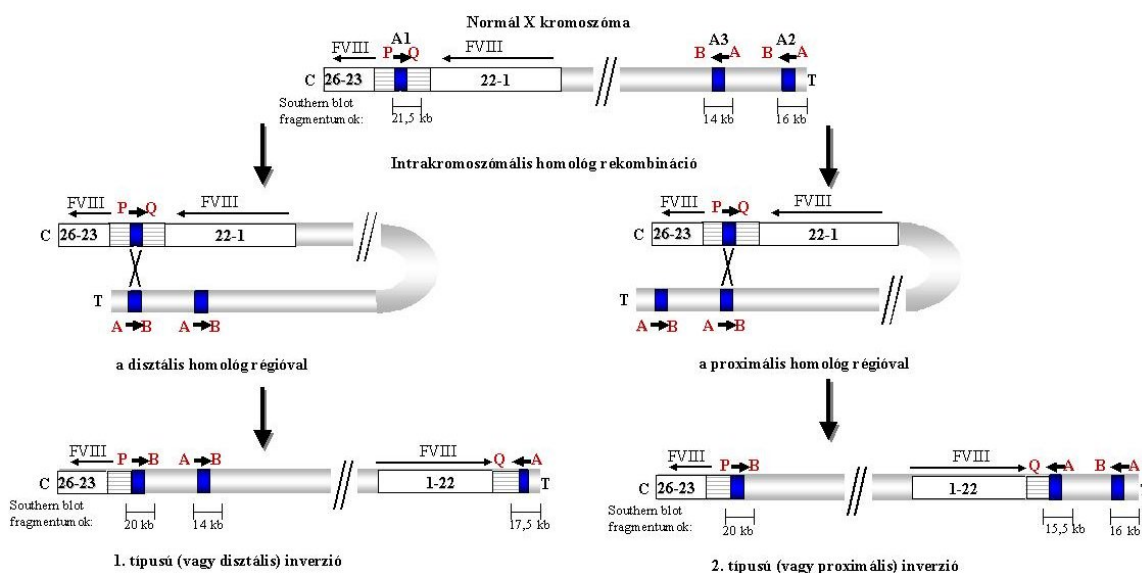
igazolást nyert. Egy esetben az édesanya a prenatális genetikai vizsgálattal előre jelzett betegség ellenére megtartotta a fiúmagzatot, akinél születése után a HA kórképe fenotípusos vizsgálattal is igazolódott.

Az említett 88 család vizsgálata során az indirekt módszerek alkalmazásának számos hátrányával szembesültünk, amelyeket csak a direkt mutáció azonosítás bevezetésével tudunk elkerülni. 25 családban csak egy haemophilia A-ban szenvedő beteg volt a családban (sporadikus családok). A 25 család közül 13-ban igazoltuk az inverzió jelenlétét, így ezekben a családokban a direkt mutáció analízissel 100%-os biztonsággal adhattunk hordozó és prenatális diagnózist. 9 családban a vizsgált potenciális hordozók (illetve egy fiú magzat) nem hordozták a beteggel megegyező allélt, így náluk kizárható volt a hordozói státusz. Három sporadikus családban három potenciális hordozó, illetve egy fiúmagzat a betegséget hordozó X kromoszómát örökölte, náluk az irodalmi adatok szerint indirekt markerekkel csak 70-80 %-os eséllyel állíthattuk, hogy hordozzák a betegséget. A családtagok hiányos elérhetősége miatt 7 családban 11 potenciális hordozónál nem tudtuk kizárni vagy megerősíteni hordozói státuszt, valamint egy obligát hordozó fiú magzatánál nem tudtuk prenatális diagnózist adni.

A HA genetikai kivizsgálás körülményeit gyökeresen átalakította a különleges, ismétlődő mutáció, a 22. intron inverzió felfedezése (Lakich 1993; Naylor 1993). A nagy méretű szerkezeti eltérés gyakori előfordulásának oka a FVIII gén 22. intronjának és a gént környező telomerikus régió szerkezetében rejlik. A FVIII gén legnagyobb, 32 kilobázis (kb) hosszúságú 22. intronja tartalmaz egy CpG szigetet (CG dinukleotid), amely kétirányú promoterként szolgál két másik, kisebb méretű átíró gén, az F8A és az F8B (FVIII asszociált A és B gének) számára. Az F8B gén a FVIII génnel megegyező orientációjú, első exonja a 22. intronban található, míg további exonjait a FVIII gén 23-26. exonjai adják. Az F8A egy rövid, intronmentes gén, amely a FVIII génnel ellentétes irányban

íródik át és egy 9,5 kb nagyságú, repetitív szekvencia része (int22h-1 vagy A1). Az int22h-1 a 22. exontól mintegy 5 kb távolságra helyezkedik el. A FVIII gén 22. intronján kívül ez a repetitív szakasz még két példányban a génen kívül is megtalálható, attól mintegy 300 és 400 kb-nyira 5' (telomerikus) irányban (proximális és disztális kópiák: int22h-3 és int22h-2, más néven A3 és A2). A három homológ kópia DNS-szekvenciáját összehasonlítva gyakorlatilag teljes (99,9%-os) azonosságot találtak (Naylor 1995).

Az intronikus és az egyik extragenikus kópia között bekövetkező intrakromoszómális homológ rekombináció eredményeként egy speciális mutáció (inverzió) jön létre, ami a *FVIII* gént két részre osztja: egy 1-22. exonokat tartalmazó és egy 23-26. exonokat tartalmazó részre, amelyek ellentétes orientációjúak és mintegy 500 kb távolságban találhatók egymástól az inverziós kromoszómán. A két telomerikus F8A gén bármelyikével létrejöhét az intrakromoszómális rekombináció, ennek alapján elkülöníthetünk disztális (1-es típusú) illetve proximális (2-es típusú) inverziót (5. ábra).

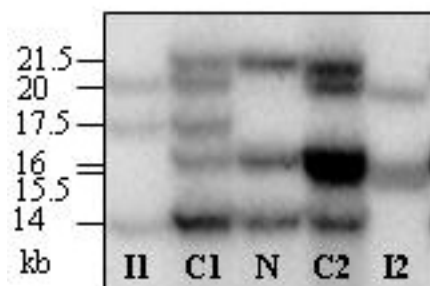


5. ábra Az 1-es típusú (vagy disztális) és a 2-es típusú (vagy proximális) 22. intron inverzió keletkezési mechanizmusa Jelmagyarázat: FVIII: a VIII. alvadási faktor génje; "1-22" és "23-26" felirattal jelölt fehér téglalap: a FVIII gén exonjai; fekete téglalapok: homológ régiók; A1, A2, A3: intronikus, disztális, illetve proximális homológ régiók; vízszintes csíkozású téglalap: a 22. intron homológ régióin kívül eső része; piros színű P, Q, A, B: hosszú PCR primerek; vékony nyilak: a FVIII gén átíródásának iránya; vastag nyilak: a homológ régiókban található F8A gének átíródásának iránya; C: centromer; T: telomer; kb: kilobázis.

A 22. intron inverzió által érintett X kromoszómáról teljes hosszúságú FVIII mRNS, így FVIII fehérje sem képződhet (Goodeve 1994). Férfiaknál az X kromoszóma monoszómiája a gametogenezis során kedvez az intrakromoszómális homológ rekombináció kialakulásának, ezért a 22. intron inverzió szinte mindig (az esetek 98%-ában) a spermatogenezis során alakul ki (Rossiter 1994; Ljung 1999).

Egy 1041 bázispár hosszúságú repetitív szekvencia jelenléte az 1. intronban és extragenikusan a géntől telomerikus irányban a 22. intron inverzió keletkezéséhez hasonló mechanizmussal 1. intron inverziót eredményezhet, amelynek gyakorisága a súlyos HA-ban szenvedő betegek között mintegy 3-5% (Bagnall 2002; Aquila 2003; Riccardi 2002).

A 22. intron inverzió kimutatására Southern blot technikát alkalmaztunk a homológ régió egy 0,9 kb nagyságú részét alkalmazva hibridizációs szondaként (probe): *Bcl*I restriktációs endonukleáz emésztést követően az intronikus és a két extragenikus homológ régiók normál esetben három jól elkülöníthető, 21,5 kb, 16 kb és 14 kb méretű fragmentumot mutatnak az autoradiogrammon (6. ábra, „N” jelzésű sáv). Ezek közül a 21,5 kb fragmentum az intronikus, a 16 kb fragmentum a disztális extragenikus és a 14 kb fragmentum a proximális extragenikus homológ régióknak felel meg (lásd az 5. ábra sémáját). Disztális inverzió esetén az intronikus és a disztális extragenikus homológ régió vesz részt az intrakromoszómális rekombinációban, ennek megfelelően az intronikus és a disztális extragenikus fragmentumok mérete módosul (20 kb, 17,5 kb, 14 kb). („I1” jelzésű sáv). Proximális inverzió esetén az intronikus és a proximális extragenikus fragmentumok mérete módosul, míg a disztális homológ régió érintetlen marad (20 kb, 16 kb, 15,5 kb) („I2” jelzésű sáv). Heterozigóta nők a normál és az inverziós mintázatot együttesen mutatják, azaz esetükben öt sáv látható („C1” sáv disztális, „C2” sáv proximális inverzió-hordozó) (Windsor 1994).



6. ábra A FVIII 22. intron inverzió kimutatása Southern blot módszerrel. Jelmagyarázat: N: normál; I1: 1-es típusú vagy disztális inverzió; I2: 2-es típusú vagy proximális inverzió; C1: 1-es típusú inverzió-hordozó; C2: 2-es típusú inverzió-hordozó; kb: kilobázis

Az értekezés beadásának időpontjáig 138 súlyos HA által érintett családból 219 személyt vizsgáltunk a 22. inverzió jelenléte szempontjából Southern blot módszerrel. Amennyiben a normáltól eltérő mintázatot észleltünk az autoradiogrammon, minden obligát és potenciális hordozót megvizsgáltunk a családban. A 138, egymással rokoni kapcsolatban nem álló családból 75 esetben (54%) találtunk a normáltól eltérő *BclI*-hasítási mintázatot: 58 esetben disztális 13 esetben proximális inverziót és négy esetben atípusos RFLP mintázatot mutattunk ki. A disztális és a proximális inverzió gyakorisága és egymáshoz viszonyított arányuk megfelelnek az irodalmi adatoknak (Antonarakis 1995). A 138 vizsgált súlyos HA-ban szenvedő családból négy esetben ritka, a normál és a disztális illetve a proximális inverzióra jellemző mintázattól eltérő képet kaptunk a Southern blot vizsgálat során. A nem típusos kóros Southern mintázat háttérében álló molekuláris eltérés felderítéséhez az érintett betegeknél további vizsgálatokat (hosszú PCR-t, a FVIII gén 14., 16., 22., 23. és 26. exonjaira specifikus PCR-t) végeztünk. Ezek eredményeképpen megállapítottuk, hogy az utóbbi négy család közül kettő esetében a FVIII gén 22. intron homológ régióját (int22h-1) érintő, nagyméretű delécio jelenlétét igazoltuk. Az egyik családnál a nagy méretű delécio a 16-22. exonokat és a 22. intront egyaránt érintette, míg a másik családnál a 22. intront és a 23-26. exonokat foglalta magában a delécio. A másik két család esetében szám feletti sávokat észleltünk a Southern blot analízis során. Részletes vizsgálatok után csak a homológ régió inszercióját eredményező, egy 22. intron inverzió

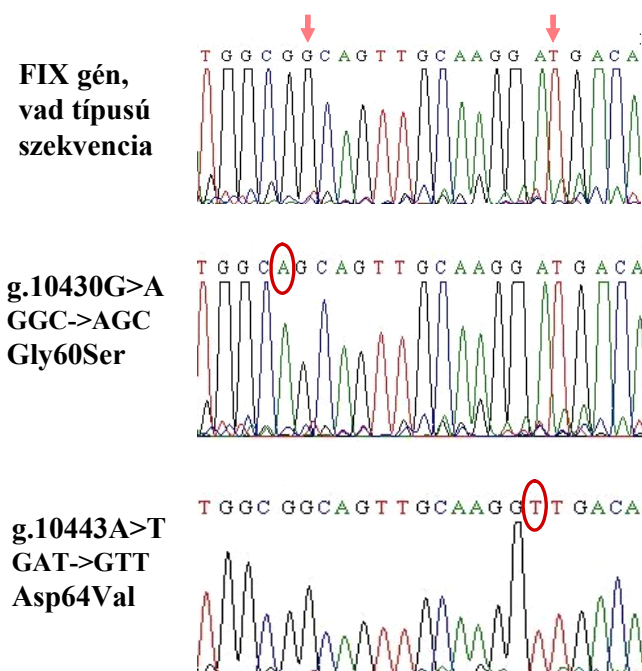
pozitív és egy negatív X kromoszóma rekombinációjából keletkező ritka szerkezeti variánssal tudtuk magyarázni a jelenséget (**2. cikk**).

Összefoglalásként megállapítható, hogy komplex vizsgálati algoritmust dolgoztunk ki és állítottunk be a HA molekuláris genetikai család- és prenatalis vizsgálatai céljára. Ezekkel az eszközökkel folyamatosan végzett országos programunk keretében jelentős számú HA-családnál végeztünk molekuláris hordozó-kimutatást és prenatalis vizsgálatot. Ezek az eredmények jelentős mértékben javítják a HA-családok gondozását. Az elvégzett vizsgálatok információtartalma számos esetben évek múlva jelentkező diagnosztikai igények kielégítéséhez járulhat hozzá.

A B típusú hemofília (HB) a IX. alvadási faktor deficienciája. Az aktivált IX. alvadási faktor fehérje a koagulációs reakcióláncolat középső részén a X. alvadási faktor proteolitikus hasításával fejt ki prokoaguláns hatását. Csökkent mennyisége vagy kóros működése ebből következően a vér-alvadási rendszer csökkent működéséhez, azaz vérzékenységhez vezet. A plazma IX. faktor aktivitása szerint súlyos, közepsúlyos, illetve enyhe vérzékenységet különíthetünk el. A betegség tünetei és klinikai jellemzői nagyfokú hasonlóságot mutatnak a HA-hoz, és a kezelés fő eleme a HB esetében is a rendszeres IX. faktor fehérje pótlás (Bolton-Maggs 2003). A 34 kb méretű IX. alvadási faktor gén (FIX) a FVIII gén közvetlen közelében, az X kromoszóma telomerikus végén, az Xq26-Xq27 régióban található. Ebből következően a HB nemhez kötött, recesszív öröklésmenetű. A FIX gén bármely régiójában, többféle mechanizmussal keletkezhet mutáció. Az értekezés készítésekor több mint 800 különböző FIX mutációt tartott nyilván a FIX mutációs adatbázis (<http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>; Giannelli 1998). A HB kisebb előfordulási gyakoriságú a HA-nál, a hazai betegek becsült száma mintegy 150. A HA területén végzett munkával párhuzamosan tevékenységünk célja a közvetett, később a közvetlen genetikai vizsgálatok beállítása volt a HB-családok számára.

Az értekezés készítésekor nyilvántartásunkban összesen 26 HB-s család szerepel. A családok megoszlása a súlyosság szerint: 16 súlyos, 6 középsúlyos és 4 enyhe kórképben szenvedő család. Programunk korai szakaszában négy, PCR-RFLP technikán alapuló közvetett (indirekt) családvizsgálati módszert állítottunk be, és összesen 10 család esetében végeztünk vizsgálatot. Közülük nyolc családnál találtunk informatív polimorf markert, 20 nőnél végeztünk molekuláris hordozó diagnosztikát, és egy esetben prenatális diagnosztikát. Két családnál azonban nem találtunk informatív polimorf markert (**1. cikk**).

A módszertani fejlesztéseknek köszönhetően 2002-től megkezdhattuk a HB-mutációk közvetlen vizsgálatát a FIX gén didezoxi láncterminációs technikán alapuló szekvenciaelemzésével. A 7. ábra a szekvencia elemzés két reprezentatív esetét mutatja.



7. ábra Két HB-ben szenvedő férfi beteg és egy kontroll személy mintájával végzett szekvencia-elemzés. A FIX gén D exonjának egy részlete látható. A felső panelen a vad típusú szekvencia, a középső és alsó paneleken egy-egy bázisszubsztitúció képe látható. Az általánosan használt szín-kód: piros=T (timin); fekete=G (guanin); zöld=A (adenin); kék=C (citozin). A mutáció következtében kicserélődött bázisokat körökkel jelöltük.

Mivel a vizsgált férfiak hemizigóták (csak egy X kromoszómájuk van), a mutációkimutatás kevésbé összetett feladat, hiszen nem ütközünk abba a problémába, amely

valamennyi szomatikus kromoszóma vizsgálatánál felmerül (lásd a III.1.2. fejezetet), hogy egymás mellett jelenlevő kétféle variánst kell a szekvenálással kimutatni.

Az értekezés készítésének időpontjáig 21 családnál sikerült 19 különböző betegségkókozó mutációt azonosítani. A hazai HB-betegeknél kimutatott mutációkat a táblázat tartalmazza.

2. táblázat Az általunk szekvenálással azonosított FIX mutációk néhány jellemzője

Sorsz.	DNS	DNS-szakasz	Következmény a FIX fehérjére	Fenotípus
1	-6G>A	1. exon	promoter, csökkent szintézis	középsúlyos/enyhe
2	g.112G>A	1. exon	Cys-19Tyr	középsúlyos
3	g.6492-6495delGAGT	2. exon/3. intron	mRNS hasítási (splice) variáns	súlyos
4	g.10430G>A	4. exon	Gly60Ser	enyhe
5	g.10443A>T	4. exon	Asp64Val	középsúlyos
6	g.17668G>C	4. intron/5. exon	IVS4ac-1	súlyos
7	g.17761C>T	5. exon	Arg116Stop	súlyos
8	g.20360T>G	5. intron/6. exon	mRNS hasítási (splice) variáns	súlyos
9	g.20497C>T	6. exon	Glu173Stop	súlyos
10	g.20564A>G	6. exon	Glu195Arg	súlyos
11	g.30106C>T	7. exon	Thr218Ile	középsúlyos
12	g.30863C>T	8. exon	Arg248Stop	súlyos
13	g.31008C>T	8. exon	Thr296Met	súlyos
14	g.31118C>T	8. exon	Arg333Stop	súlyos
15	g.31133C>T	8. exon	Arg338Stop	súlyos
16	g.31167T>A	8. exon	Phe349Tyr	enyhe
17	g.31170G>A	8. exon	Cys350Tyr	súlyos
18	g.31202T>C	8. exon	Cys361Arg	súlyos
19	deléció	1-8. exon	a teljes kódoló régió deléciója	súlyos

A még nem közölt mutációt vastag karakterekkel jelöltük.

Az Asp64Val mutáció nem szerepel a nemzetközi adatbázisban. A Gly60Ser és az újonnan felfedezett Asp64Val mutáció két-két családban fordul elő. A FIX gén szekvenálásával a vizsgált 21 családból 11 esetben diagnosztizáltunk hordozó-státuszt, 6 esetben pedig kizártuk a hordozó-jelleget. A mutációk keletkezési típus és lokalizáció szerinti megoszlása megfelel a nemzetközi adatoknak (Giannelli 1998).

A közvetlen mutáció-kimutatás bevezetése jelentős előrelépés a HB hazai molekuláris diagnosztikájában, mivel gyorsítja, és pontosabbá teszi a hordozó- és a prenatális diagnosztikát.

III.1.2. Örökletes angioneurotikus oedema és mutációs adatbázis

Az örökletes angioneurotikus oedema (HANO) a komplement rendszer egyik fontos gátló fehérjéje, a C1 észteráz inhibitor (C1-INH) deficienciája miatt alakul ki (Donaldson & Evans 1995; Davis 1986; 1988). Az autoszomális domináns öröklésmenetű, mintegy 1:50 000 gyakoriságú kórképre rohamokban jelentkező, bőr, illetve nyálkahártya alatti, légúti valamint gastrointestinális oedemák jellemzők (Cicardi & Agostoni 1996). A feltételezett gyakorisági adat alapján a magyarországi betegek száma 200-500 közé tehető. A komplement rendszer laboratóriumi vizsgálatával elkülöníthető az összes HANO-beteg mintegy 85%-át kitevő, I. típusú (csökkent C1-INH fehérje szint), illetve a II. típusú (normális vagy emelkedett fehérje szint, kóros fehérje funkció) rendellenesség. A klinikai tünetek azonban nem különböznek számottevően a két típus között (Winkelstein 1995).

A 104 kDa tömegű, 478 aminosavból álló C1-INH fehérje a serpin típusú szérumban proteáz inhibitorok csoportjába tartozik, amelyet elsősorban a májsejtek, kisebb részben monocyták és fibroblasztok is szintetizálnak. A fehérje elsődleges szerkezete 20 százalékos homológiát mutat más szerin proteáz inhibitorok, például az antitrombin III, illetve az α_1 antitripszin szerkezetével (Bock 1986; Carter 1991).

A C1-INH fehérje fő funkciója a komplement-rendszer működésének szabályozása az aktivált C1 észteráz enzim gátlása, továbbá egyes kinin-felszabadító és véralvadási enzimek gátlása (Späth 1998). A fehérje cél-proteázai a C1-komplex két alegysége (C1r és C1s), a kallikrein, a plazmin, a XIIa (Hageman faktor) és a XIa faktor fehérjék. A plazma C1-INH deficienciája esetén (csökkent transzkripció, és/vagy nem működő fehérje) a

komplement kaszkád klasszikus útjának autoaktivációja jön létre, azaz fokozódik a C1 észteráz-aktivitás, amelynek eredményeként csökken a plazma C2- és C4-szintje. Az elégtelen mértékben gátolt komplement-aktivitás nyomán keletkező C2-peptidek vazóaktív, kininszerű mediátorok (C2-kinin) felszabadulását váltják ki. Másfelől, szövetkárosodás esetén, a XII. véralvadási faktor fehérje hatására a prekallikreinből kallikrein, a nagy molekulatömegű kininogénből bradikinin szabadul fel. A C2-peptidek és a bradikinin egyaránt fontos szerepet játszanak az angio-oedéma jellegzetes tüneteinek kialakulásában (Schreiber 1987; Cicardi & Agostoni 1996; Nielsen 1996; Cugno 1996).

A családi anamnézis, a tünetek megjelenési formája és gyakorisága felvetheti a HANO gyanúját, de a pontos, definitív diagnózis felállítása az esetek többségében csak a komplement faktor-szintek és aktivitás laboratóriumi meghatározásával lehetséges. A kétféle HANO kórkép elkülönítéséhez szükség van a C1-INH fehérje szint és aktivitás meghatározására (3. táblázat). Rohamok alatt mindkét típusú HANO esetén a C2 és C4 faktorok plazmaszintje a normál érték alá csökken a C1s kórosan fokozott működése miatt. Az alacsony C4-szint az egyik legérzékenyebb mutatója a betegségnek. A tipikus laboratóriumi eltéréseket a 3. táblázat összegzi.

3. táblázat Jellemző komplement-eltérések örökletes angioneurotikus oedemában

C1-INH hiány típusa	C1-INH koncentráció	C1-INH aktivitás	C1	C4	C3
HANO-I	↓	↓	N	↓	N
HANO-II	N vagy ↑	↓	N	↓	N

A C1-INH koncentráció meghatározás standard módszere az ELISA, a referencia-érték 0,2 g/L. A C1-INH aktivitás meghatározására többféle módszer terjedt el: enzimátikus assay kromogén szubsztráttal; az immunológiai reaktivitású C1r mennyiség C1-INH hatására bekövetkező csökkenésének kimutatása; a C1-INH-C1s komplex kimutatása ELISA-val. A C1-INH aktivitást a normál kontroll százalékában adják meg, a 60% alatti érték számít kórosnak (Späth 1998). N: normál; ↓: csökkent; ↑: emelkedett.

A kórkép patomechanizmusának tehát fő eleme a változó mértékben fokozott komplement aktivitás, az ennek következtében kialakuló komplement egyensúly-zavar, továbbá a véralvadási kaszkád és a kallikrein-kinin rendszerek eltérései. A tünetek

kialakulásáért a kapillárisok és venulák tágulata következtében kialakuló, nem gyulladásos jellegű, a bőr, illetve a nyálkahártyák alatti szöveteket (submucosus, illetve subcutan) érintő duzzanat felelős (Cicardi & Agostoni 1996). A bőr-tünetek a leggyakrabban az arcon, a végtagokon és a nemi szerveken jelentkeznek. A nyálkahártya-oedema legveszélyesebb megjelenési formája a gége-oedema, amely akut életveszélyt jelent. Gyakori a bélcsatorna nyálkahártyájának érintettsége is, amely nehezen körülírható hasi panaszokat okoz, és könnyen összetéveszthető a bélcsatorna egyéb heveny gyulladásos kórformáival. Ennek következtében gyakran kerül sor indokolatlan sebészeti beavatkozásra is (Agostoni 1992).

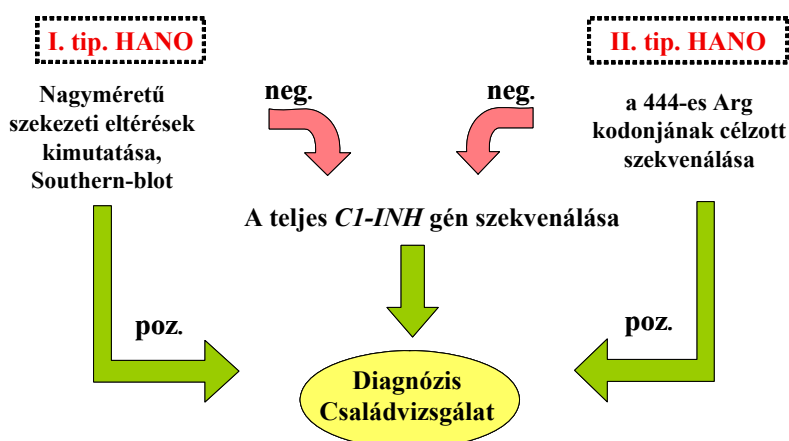
A betegség általában az iskolás évek alatt jelentkezik, és előre jósolhatatlan gyakoriságú, nehezen azonosítható kiváltó okok következtében kialakuló rohamok jellemzik. A kezelés legfontosabb eleme a C1-INH fehérjét tartalmazó koncentrátumokkal végzett szubsztitúciós kezelés, amelyet rohamok idején, de különösen veszélyeztetett esetekben megelőző jelleggel is alkalmaznak. A hosszú távú megelőző kezelésben fontos szerepe van a gyengített hatású androgéneknek és a fibrinolitikus rendszer gátlószereinek (Cicardi & Agostoni 1996). Az újabb, klinikai kipróbálás fázisában levő gyógyszerek (rekombináns C1-INH koncentrátum, kallikrein-inhibitor és bradikinin receptor-anatagonista) jelentősen bővíthetik a betegek kezelési lehetőségeit (Williams 2003; Turner 2001; Akbary 1996).

A C1-INH fehérjét kódoló gén (*C1-INH*, *SERPING1*) a 11. kromoszómán (11q12-q13.1) található, 17 kilobázis nagyságú és 8 exonból áll. A génről keletkező mRNS 1,5 kb méretű, a gén által kódolt polipeptid lánc pedig összesen 478 aminosavat tartalmaz, amelyet egy 22 aminosavból álló szignál peptid egészít ki (Tosi 1986; Stoppa-Lyonnet, 1987; Carter 1991). Az 1. exon és a 8. exon 3' vége nem transzlálódó mRNS szakaszokat kódol. A *C1-INH* gén sajátossága az, hogy 17 teljes ismétlődő *Alu*-szekvenciát tartalmaz.

Az emberi genomban igen elterjedt, ismétlődő szekvenciák csoportját képező *Alu*-szekvenciák közelítően 300 bázispár hosszúságú jellegzetes bázissorrendű nukleinsavszakaszok, melyeket az *Alu* restrikciós endonukleázok hasítani képesek. Az *Alu*-szekvenciák valódi szerepe nem ismert, ugyanakkor fontosak, mivel gyakran vesznek részt DNS-rekombinációban, amely például a *CI-INH* gén esetében kóros intragenikus átrendeződéshez vezethet (Ariga 1990; Stoppa-Lyonnet 1990).

Az I. típusú HANO (HANO-I) esetében a *CI-INH* gén bármely régióját érintheti a mutáció. Az eddig ismertté vált mintegy 150 *CI-INH* mutáció körében valamennyi, ismert mechanizmussal kialakuló DNS-szerkezeti változás szerepel. Nagy valószínűséggel az *Alu*-szekvenciák fokozott gyakorisága következtében a nagyméretű szerkezeti eltérések mintegy 15%-ban fordulnak elő (Stoppa-Lyonnet 1990; Tosi 1998). A II. típusú HANO (HANO-II) esetében viszont a DNS-eltérés a reaktív centrum régióját kódoló, a 8. exonban elhelyezkedő rövid szakaszt érinti.

A rendelkezésre álló információk birtokában a 8. ábrán bemutatott DNS-vizsgálati algoritmust dolgoztuk ki a hazai HANO-ban szenvedő betegek kóroki mutációinak feltérképezésére.

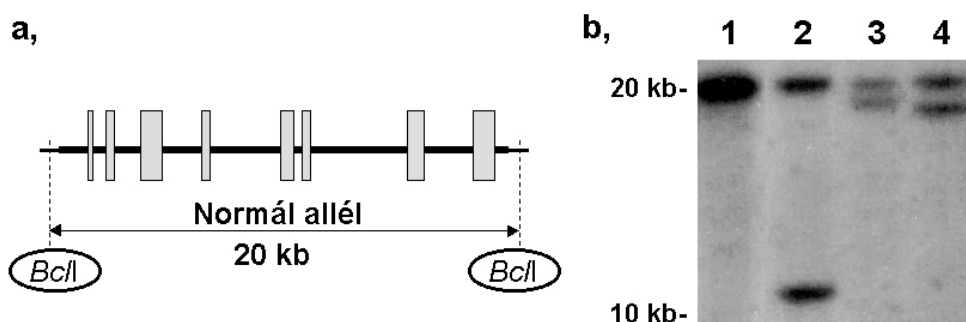


8. ábra A HANO-betegeknél végzett genetikai vizsgálatok általunk alkalmazott protokolljának sémája. Rövidítések: neg.: negatív; poz.: pozitív eredmény.

A kidolgozott protokoll szerint HANO-I esetében elsőként Southern blotting elemzést végzünk az 1 kb-nál nagyobb méretű DNS-szerkezeti eltérések kimutatására. A negatív

esetekben elvégezzük a C1-INH gén teljes kódoló régiójának és az mRNS-hasítási (splicing) helyek közvetlen szekvencia analízisét. A HANO-II esetekben viszont közvetlenül a reaktív centrumot kódoló 8. exon szekvencia analízisét végezzük.

Diagnosztikai algoritmusunkat 26 HANO által érintett család (23 HANO-I, és 3 HANO-II család, összesen 64 beteg) esetében alkalmaztuk. A 23 HANO-I család közül 4 esetben mutattunk ki nagyméretű deléciót. A 9. ábra a Southern blotting analízis során felfedezett három, nagyméretű C1-INH gén szerkezeti variáns szempontjából pozitív minta autoradiográfiás felvételét mutatja. Az „a” panelen bemutatott séma ábrázolja a gén szerkezeti elemek és az általunk használt *BclI* restrikciós endonukleáz hasítási helyek egymáshoz viszonyított elhelyezkedését, amelyből kiderül, hogy normál esetekben 17 kb méretet meghaladó DNS-fragmentumot várunk, mivel a két hasítási hely a teljes gént közrefogja. A „b” panelen látható kép ennek megfelelő elrendeződést mutat: az 1-es sávban vizsgált kontroll minta egyetlen, 20 kb nagyságú DNS-fragmentummal rendelkezik, tehát homozigóta vad típusú. A 2-4. sávokban elemzett, HANO-betegektől származó minták két-két, eltérő méretű, de egyenlő intenzitású DNS-fragmentumot tartalmaznak, tehát heterozigóták az eltérő nagyságú deléciók szempontjából. Ez összhangban van a kórkép domináns öröklésmenetével.



9. ábra Southern blotting vizsgálat a C1-INH gén nagyméretű szerkezeti eltéréseinek kimutatására. a, panel: A C1-INH gén, az exonok és intronok, és a *BclI* restrikciós endonukleáz hasítási helyei térbeli elrendeződésének sematikus ábrája. A vastag vonal: a gén teljes szakasza, szürke téglalapok: exonok); b panel: A Southern blot analízis autoradiográfiás képe. 1: normál mintázat, 2-4: deléziós mutánsok.

A vizsgált 23 HANO-I beteg közül tehát négy (17,4%) esetben mutattuk ki a *C1-INH* gén nagyméretű delécióját. Ez megfelel a nemzetközi adatoknak (Stoppa-Lyonnet 1987; Tosi 1998). A négy pozitív esetből egynél mintegy 9 kb méretű, a másik háromnál pedig 2-4 kb méretű deléciókat észleltünk.

A kisebb kiterjedésű eltérések esetében fontos kérdés volt annak bizonyítása, hogy ezek a deléciók érintik-e valamelyik exont, hiszen ebben az esetben tekinthetjük valóban betegség-okozónak a felfedezett mutációt. A kérdés megválaszolására valós idejű PCR és relatív mennyiségi elemzési technikát alkalmaztunk. Ennek során exon-specifikus PCR-reakciókat végeztünk a 3-8. exonokat amplifikáló primerekkel egy kettős szálú DNS-re specifikus SybrGreen elnevezésű festék jelenlétében. Minden esetben egy normál és egy deléció szempontjából pozitív mintát hasonlítottunk össze. A valós idejű PCR-készülékben végrehajtott mérés során a készülék minden ciklusban rögzíti az aktuális fluoreszcencia értéket, ami arányos az abban az időpillanatban jelenlevő kettős szálú PCR-termék mennyiségével. A készülék által számított, legnagyobb fluoreszcencia-változást mutató ciklusszám, a crossing point érték pedig információt ad a kiindulási templát mennyiségére vonatkozóan. A normál és a deléció szempontjából pozitív minták crossing point értékeinek összehasonlítása azt mutatta, hogy mindhárom esetben a 4. exonra specifikus PCR-ek esetében volt szignifikáns mértékben nagyobb különbség a két minta crossing point értéke között az összes többi exonhoz viszonyítva (lásd a **4. cikket**). Ez az eredmény mindhárom esetben a 4. exon érintettségét támasztotta alá. Az *Alu*-szekvenciák 3. és 4. intronokban észlelhető gyakorisága miatt ez az eredmény megfelel a várakozásnak.

A fennmaradó 19 HANO-I esetben didezoxi-láncterminációs technikával és automata kapilláris elektroforézissel elvégeztük a *C1-INH* gén teljes kódoló régiójának és az mRNS hasítási helyek (az exon-szélekkel szomszédos szakaszok) teljes szekvencia elemzését.

4. táblázat Az általunk azonosított 13, kódoló régiót érintő C1-INH gén mutáció a keletkezési mechanizmus és a lokalizáció szerinti csoportosításban

Genomiális DNS-pozíció	Exon	Aminosav-pozíció	Következmény
Stop kodon kialakulásához vezető bázis-szubsztitúciók (non-sense mutációk):			
g.2238C>T	3	p.Gln10Stop	A fehérjeszintézis idő előtti leállása, megrövidült fehérjelánc.
g.4467C>T	4	p.Gln201Stop	
g.16872C>T	8	p.Arg472Stop	
Kisméretű deléciók/inszerciók a kódoló régióban:			
g.2534_2535 delCT	3	n.é.	A deléció közvetlen közelében stop-kodon keletkezik.
g.2579_2620 del42bp	3	n.é.	Megmarad a helyes leolvasási keret, de a C1-INH fehérje A hélixéből 14 aminosav hiányzik.
g.14107delA	7	n.é.	Leolvasási-keret eltolódás, korai stop-kodon keletkezik 22 aminosav-távolságban.
g.16749_16775dup	8	n.é.	Leolvasási-keret eltolódás, a reaktív centrum aminosavai is megváltoznak.
Aminosav-cseréhez vezető bázis-szubsztitúciók (mis-sense mutációk):			
g.2533G>A	3	p.Cys108Tyr	A Cys108 és Cys183 aminosavak közötti diszulfid híd nem alakulhat ki. Egy másik közölt, kóroki mutáció (Cys183Tyr) a diszulfid híd kialakításában résztvevő partner aminosavat érinti (Zuraw 2000).
g.14224A>T	7	p.Asp386Val	Polaritás- és töltés-változással járó aminosav-csere. A feltételezett I. hélix második aminosavát érinti (Bock 1986).
g.14181A>C	7	p.Thr372Pro	Korábban leírt kóroki mutáció (Verpy 1996).
g.16810T>A	8	p.Val451Glu	Két másik közölt, kóroki mutáció [Val451Met, Val451Gly (Verpy 1996, Blanch 2002)] érinti ezt az aminosavat. A Val451 aminosav kiemelkedő fontosságú a C1-INH fehérje megfelelő térszerkezetének kialakulásához (Eldering 1995, Huber & Carrell 1989).
g.16870G>A	8	p.Gly471Glu	Korábban leírt kóroki mutáció, kóros térszerkezetű fehérje keletkezik (Blanch 2002).
g.16885C>G	8	p.Pro476Arg	Egy másik közölt, kóroki mutáció (Pro476Ser) érinti ezt az aminosav helyet (Verpy 1996)

A korábban nem közölt mutációkat vastagítással jelöltük. A nukleotid számozásnál a Carter és mtsai által közölt számozást alkalmaztuk, amely szerint a +1 pozíció az 1. (nem transzlálódó) exon első bázisa, azaz a transzkripció iniciációs hely. Ez a GenBank nagyobb méretű referencia szekvenciában (X54486) a 1183-as pozíciójának felel meg.

A számozási formátum kialakításánál az Antonarakis (1998) által közölteket vettük figyelembe. Rövidítés: n.é.: nem értelmezhető.

Mindösszesen 16, egyetlen bázist vagy néhány bázisos DNS-szakaszt érintő kóroki mutációt azonosítottunk, mivel három mutáció két-két, a rendelkezésünkre álló adatok szerint egymással rokoni kapcsolatban nem álló családnál fordult elő. Az általunk kimutatott non-sense, deléció/inszerciós és mis-sense mutációkat a 4. táblázat, az mRNS hasítási variánsokat pedig az 5. táblázat tartalmazza alapvető keletkezési mechanizmus és azon belül pozíció szerint csoportosítva.

A 16 kóroki mutáció közül 13 még korábban nem ismert eltérés volt, ezeket a táblázatban vastagon szedett karakterekkel jelöltük. A felfedezett új mutációk keletkezési mechanizmusuk szerint a következőképpen csoportosíthatók: 2 non-sense (stop-kodont eredményező bázis-csere); 4 kisméretű deléció/duplikáció; 4 mis-sense (aminosav-cserét eredményező bázis-csere); és 3 mRNS-hasítási (splice) variáns. Az említett négy mechanizmus közül a non-sense és a deléciók esetében egyértelműen valószínűsíthető a fehérjelánc jelentős megrövidülése. Ezek a mutációk további vizsgálatok nélkül kóroki mutációnak tekinthetők.

Az újonnan felfedezett négy mis-sense mutáció kóroki szerepének bizonyítása összetettebb feladat. Első lépésként megállapítottuk, hogy konzervált, szerkezeti szempontból fontos aminosavat érintő, és/vagy polaritás/töltésváltozással is járó cserék következtek be. Megerősítettük a családon belüli szegregációt, azaz az egészséges családtagoknál vad típusú szekvenciát, érintett családtagoknál pedig heterozigóta mutációt észleltünk az érintett szakaszon. A további bizonyítás érdekében, az esetleges polimorfizmus-jelleg kizárására három újonnan felfedezett mis-sense mutáció (Cys108Tyr, Asp386Val és Pro476Arg) szempontjából vizsgáltunk egy 50 egészséges személyből álló kontroll csoportot, azaz 100 egészséges kromoszómát. Erre a célra két mutáció esetében allél-specifikus primereket terveztünk, és az egyik szekvenáló primerrel együtt, multiplex

PCR formájában végeztünk allél-specifikus PCR-t. A harmadik mutációt *ScrFI* restrikciós endonukleázzal végzett PCR-RFLP módszerrel mutattuk ki. Mindhárom mutáció esetében a kontroll csoport egyöntetűen negatív eredményt adott.

5. táblázat Az általunk azonosított 3 mRNS hasítási (splice) variáns lokalizáció szerinti sorrendben

Mutáció	intron	konszenzus	Bázis pozíció az mRNS splicing régióban					
			-1	+1	+2	+3	+4	+5
			G	G	T	A/g	A/t	G
IVS2SD+1G>A	2.	normál	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	T	<u>G</u>
		mutáns	<u>G</u>	A	<u>T</u>	<u>A</u>	T	<u>G</u>
g.2696_2697insT	3.	normál	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>G</u>
		mutáns	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	T	<u>A</u>	A
IVS3SD+1G>A	3.	normál	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>G</u>
		mutáns	<u>G</u>	A	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>G</u>

A mutációk által érintett bázisokat vastagítással, nagyobb méretű karakterekkel és szürke mezővel jelöltük. A hasítási régióra jellemző konszenzus szekvenciát Zhang és mtsai (1998) alapján képeztük. A -1 jelzésű pozíció az exon utolsó bázisát jelöli, a +1 jelzésű pozíció pedig az első intronikus bázist.

A három új mRNS-hasítási (splice) variáns (5. táblázat) közül két G>A bázis-csere a leginkább konzervált, exon-határral szomszédos, +1 pozíciójú guanint érinti, míg a harmadik mutáció, egy T-inszerció (beékelődés) a +3 pozícióban eltolja a konszenzus hasítási donor szekvenciát. A pozitív családon belüli szegregáció mellett a mRNS-hasítási (splice) variáns mutációk hatását az Interneten hozzáférhető, Neural Network Splice Site Prediction elnevezésű számítógépes program (Reese 1997) segítségével is vizsgáltuk. A program a választott 0,1-es valószínűségi küszöb érték mellett egyik szerkezeti variáns esetében sem jelzett mRNS hasítást. Mind az újonnan felfedezett mis-sense mutációk, mind az mRNS-hasítási (splice) variánsok esetében elvégeztük a teljes kódoló régió szekvencia-elemzését, és további szekvencia eltérést nem találtunk.

A három HANO-II-ben szenvedő család esetében a 8. exon reaktív centrumot tartalmazó régiójának célzott szekvencia-analízisével mindhárom, egymással rokoni kapcsolatban nem levő családnál azonos, korábban leírt, aminosav-cserét eredményező

mutációt, a g.16788C>T (Arg444Cys) szekvencia-eltérést azonosítottunk (Skriver 1989; Pappalardo 2000).

Összefoglalva, az általunk beállított molekuláris genetikai módszerekkel hazánkban elsőként végeztük el sikeresen a kóroki mutációk azonosítását egy jelentős számú HANO-betegcsoportnál. A kimutatott 16, gyakorlatilag valamennyi keletkezési mechanizmust érintő betegség-okozó mutáció közül 13 bizonyult korábban még ismeretlennek. A nagy számú új, és többféle keletkezési mechanizmusú mutáció felfedezése alátámasztja a C1 inhibitor gén fokozott genetikai instabilitását, elősegítheti a hazai és nemzetközi szinten végzett, további molekuláris diagnosztikai tevékenységet, és a genotípus-fenotípus, illetve a szerkezet-funkció összefüggések felderítését (**3. cikk**).

A HANO szakterületén folyó európai együttműködés keretében egyértelmű igényként merült fel a *CI-INH* gén internetes lokusz-specifikus mutációs adatbázisának létrehozása. Ezt a tevékenységet a következő célkitűzésekkel kezdtük meg: (i) a *CI-INH* gént érintő valamennyi ismert DNS-szekvencia változás folyamatosan megújuló, legteljesebb gyűjteményének létrehozása; (ii) az összegyűjtött adatok sokoldalú kereshetősége; (iii) az érintett laboratóriumok közötti információ-áramlás elősegítése; (iv) hasznos információ-forrás biztosítása egy-egy új szerkezeti variáns betegség-okozó szerepének eldöntéséhez.

Az általunk elkészített, a <http://hae.biomembrane.hu> internet címen elérhető, HAEdb-nek keresztelt adatbázis a MySQL szabadon hozzáférhető (www.mysql.com) adatbázis kezelő rendszert alkalmazza. A grafikus interface-t PHP (www.php.net) programnyelven írtuk. A rendszer korlátlan hozzáférhetőségű (jelszó nélküli) részében két fő csoportban kérhetők le a mutációk: az 1 kb méretet meghaladó nagy (gross) szerkezeti eltérések, illetve minden egyéb, ebbe a kategóriába nem illő, rövidebb DNS-szakaszt érintő (micro) szerkezeti eltérés. Egy mutáció esetében a többféle elnevezés mellett a 6. táblázatban felsorolt kiegészítő információkat tartalmazza a rendszer. Fontos a „Megjegyzés” rovat,

amelybe van lehetőség az adott mutáció ismételt kimutatásának tényét vagy további bármilyen információt (populációgenetika, módszerrel kapcsolatos, fenotípusos sajátosság) rögzíteni.

6. táblázat *Az egyes mutációkhoz tartozó járulékos, rögzített adatok*

Nagy méretű (gross) mutációk	Kis méretű (micro) mutációk
Típus (inszerció/delécio)	Nukelotid szintű eltérés
Méret (kilobázis dimenzióban)	Pozíció (promoter/exon/intron)
Érintett exon(ok)	A mutáció molekuláris szintű következménye
Betegség-okozó jelleg bizonyítható-e	
Hivatkozás (PubMed formátum)	
A hivatkozás egyedi azonosítója (PubMed UID)	
Családi környezet (sporadikus/pozitív/nem ismert)	
A rokoni kapcsolatban nem álló érintett családok száma	
Megjegyzés	

Rövidítés: UID: egyedi azonosító.

Bármilyen szempontú keresés, és a keresés eredményének szokásos táblázatkezelő programokkal kompatibilis letöltése is elvégezhető. Az adatbázis további alapfunkciója néhány hasznos, HANO-val kapcsolatos egyéb adatbázis internetes elérhetőségének megadása, valamint az összes mutációt az adott lokalizációban feltüntető, pdf formátumú, időközönként az adminisztrátor által frissített C1-INH géntérkép letölthetősége.

Új adatbevitelre vagy a meglévő adatok módosítására a regisztrált, jelszóval rendelkező felhasználóknak van lehetőségük. Az adatbevitelt tájékoztatókkal, ismertetőkkal próbáltuk megkönnyíteni. A rögzített adatok módosítására csak annak van jogosultsága, aki eredetileg rögzítette azt. A megjegyzés rovatba viszont minden regisztrált felhasználó rögzíthet további információt más által kezelt rekordok esetében is. Igény esetén a rendszer a változásokról értesítést küld elektronikus levél formájában.

A mutációk elnevezése (számozása) különös fontosságú a későbbi összehasonlíthatóság és összesített elemzések szempontjából (Horaitis & Cotton 2004). Az elnevezések összehangolása során figyelembe vettük a HUGO (Human Genome Organisation) és a

Human Genom Variation Society (<http://www.hvgs.org/mutnomen>) aktuális ajánlásait (Antonarakis, 1998; den Dunnen & Antonarakis, 2000; den Dunnen & Antonarakis, 2001). Ugyanakkor, a korábban a témában megjelent közlemények többségi névhasználatát sem volt célszerű figyelmen kívül hagyni. Eszerint a nukleotid számozás az 1. (nem transzlálódó) exon első bázisával (transzkripció iniciációs hely) kezdődik (Carter 1991). Nulla pozíciót nem használunk, így a +1-től 5' irányban levő első bázis jelzése -1. Az aminosav számozás esetén az 1. aminosav a 22 aminosavból álló szignál peptid lehasadása utáni funkcionális fehérje első (aszparagin, Asn) aminosava. Eszerint a szignál peptidet érintő mutációk aminosav szinten negatív jelzést kapnak.

7. táblázat A HAEdb-ben található valamennyi mutáció betegség-okozó mechanizmus szerinti bontásban

Mutáció típus	Rekordok száma (%)
Nagy méretű mutációk	22 (15)
Mis-sense (aminosav-csere)	53 (36)
Olvasási keret eltolódás (frameshift) inszerció/delécio miatt	35 (23,8)
Non-sense (stop-kodon)	13 (8,8)
mRNS hasítási (splice-site) variáns	13 (8,8)
Olvasási keret eltolódást nem okozó, kisméretű inszerció/delécio	7 (4,8)
Promoter	2 (1,4)
Egyéb	2 (1,4)
Összesen:	147 (100)

A HAEdb a dolgozat írásakor 147 különböző *CI-INH* mutációt tartalmazott a 7. táblázatban bemutatott, keletkezési mechanizmus szerinti megoszlásban. Az összesített statisztika azt mutatja, hogy gyakorlatilag valamennyi mechanizmussal keletkezhet mutáció a *CI-INH* gén szekvenciájában. Feltehetően az Alu-szakaszok miatt jelentős gyakoriságúak a nagyméretű mutációk (Carter 1991). A legnagyobb hányadot az aminosavcserét okozó mutációk teszik ki, de szintén gyakoriak az olvasási keret eltolódást okozó inszerciók/delécioik.

A mutációk pozíciója szerinti leválogatás (8. táblázat) azt mutatja, hogy a gén egészét érinthetik a mutációk. Ha a mutációk gyakoriságát 100 bp kódoló régióra vonatkoztatjuk, a 8. exon kiemelkedő érintettsége észlelhető. Ennek egyik oka, hogy a C1-INH fehérje legfontosabb szerkezeti elemét, a reaktív centrumot ez az exon kódolja. Másik ok, hogy a kezdeti genetikai vizsgálatok során több laboratóriumban csak a 8. exonban kerestek mutációt, és ezeket az adatokat közzétették (Blanch 2002; Freiberger 2002).

8. táblázat A HAEdb-ben található micro mutációk DNS-szerkezeti egység szerinti bontásban

Pozíció	A kódoló régió mérete	Mutációk száma	Mutációk száma 100 bp kódoló szakaszra vetítve
<i>promoter</i>		2	
1. exon		1	
<i>1. intron</i>		1	
2. exon	50	2	4
<i>2. intron</i>		3	
3. exon	498	18	3,6
<i>3. intron</i>		2	
4. exon	134	11	8,2
<i>4. intron</i>			
5. exon	203	12	5,9
<i>5. intron</i>		1	
6. exon	139	9	6,5
<i>6. intron</i>		2	
7. exon	219	13	5,9
<i>7. intron</i>		1	
8. exon	253	47	18,6
Összesen:	1496	125	

A nem kódoló szakaszok mérete: 1. exon: 37; 2. exon 5' vég: 22; 8. exon 3' vég: 264. A 100 bp kódoló szakaszra vetített mutáció-mennyiség számítása: mutáció szám/kódoló region méret \times 100. A számítást csak a kódoló régiót tartalmazó szerkezeti egységek esetében végeztük el. A teljes mértékben nem kódoló szakaszokat tartalmazó szerkezeti egységeket dőlt karakterrel jelöltük.

A HAEdb-t a jelenleg hozzáférhető, több mint 200 hasonló, egy gént tartalmazó DNS-szakaszra koncentrálnál (locus specific database, LSDB) adatbázisokéival összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy az általunk készített adatbázis az átlagot meghaladó funkciókkal és lehetőségekkel rendelkezik. Hasonló következtetést vonhatunk le, ha a Clausters és mtsai (2002) által közölt „ideális” adatbázis jellemzőivel végezzük az összehasonlítást. Ugyanakkor kíváncsi lehet valamilyen szintű kapcsolat kiépítése saját mutációs

adatbázisunk és a HANO betegek klinikai adatait tartalmazó nemzetközi adatbázis (www.haeregister.org), esetlegesen a szerpin fehérjével foglalkozó fehérje-szerkezeti adatbázisokkal (Bos 2002).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az általunk újonnan létrehozott dinamikus és interaktív mutációs adatbázis segítséget adhat új mutációk lokalizációjában, esetleges kóroki szerepük meghatározásában, és megkönnyítheti a közös adatfeldolgozást, illetve nemzetközi populációs tanulmányok végzését (**4. cikk**).

III.1.3. Fiatalkori (juvénilis) hemokromatózis

Az elmúlt évtizedben jelentős előrelépés történt a vassfelhalmozódással járó kórképek,

9. táblázat Vassfelhalmozódáshoz vezető, ismert genetikai hátterű fontosabb kórképek néhány jellemzője

Kórkép	Gén	Fehérje	Kromoszóma lokusz	Öröklés-menet	Hivatkozás
1-es típusú hemokromatózis	<i>HFE</i> (<i>HLA-H</i>)	HFE	6p21.3-6p22.1	Inkomplett AR	Feder (1996)
Fiatalkori hemokromatózis	<i>HJV</i> (<i>HFE2</i>)	hemojuvelin	1p21	AR	Papanikolau (2004)
	<i>HAMP</i> (<i>HEPC</i>)	hepcidin	19q13	AR	Roetto (2003)
3-as típusú hemokromatózis	<i>TFR2</i>	2-es típusú transzferrin receptor	7q22	AR	Camaschella (2000)
4-es típusú hemokromatózis	<i>SLC40A1</i> (<i>IREG1</i>)	ferroportin	2q32	AD	Montosi (2001) Njajou (2001)
Autoszomális domináns vassfelhalmozódás	<i>H-ferritin</i>	H-ferritin	11q13	AD	Kato (2001)
Hiperferritinémi a/cataracta szindróma	<i>L-ferritin</i>	L-ferritin	19q13.3-13.4	AD	Beaumont (1995), Martin (1998)
Acoeruloplasminémia	<i>CP</i>	coeruloplasmin	3q23-24	AR	Harris (1995), Bosio (2000)

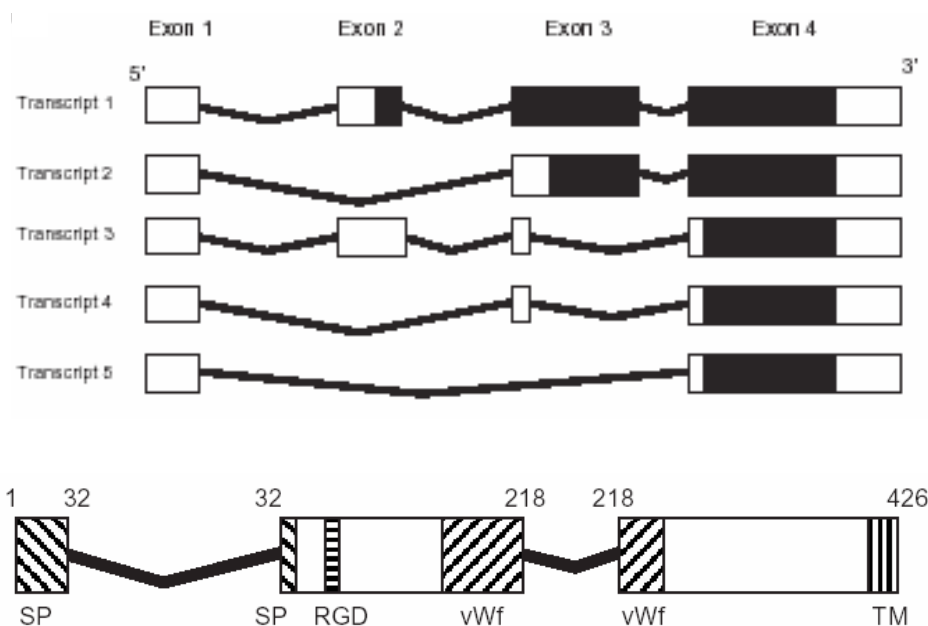
Robson és mtsai (2004) alapján. AR: autoszomális recesszív öröklésmenet; AD: autoszomális domináns öröklésmenet.

azaz hemokromatózis-kórformák pontos genetikai hátterének megismerése terén. A felnőttkori (klasszikus), 1-es típusú hemokromatózis pontos genetikai mechanizmusát 1996-ban ismertük meg (erről részletesen lásd a III.2.1. fejezetet), majd azt követően egyre több génről derült ki, hogy szerkezeti eltérése esetén kóros vasfelhalmozódás alakulhat ki. A szóban forgó rendellenességek néhány alapvető jellemzőjét mutatja a 9. táblázat (Robson 2004).

Ebben a fejezetben egy fiatalkori hemokromatózisban (juvenilis hemokromatózis, JH) szenvedő beteg vizsgálatával kapcsolatos eredményeinket mutatom be, míg az 1-es típusú hemokromatózis populációgenetikai vetületeit a III.2. a „*Genetikai kockázati tényezők populációs vizsgálata*” című fejezetben tárgyalom. A JH-t a korábbi, általában a húszas-harmincas években jelentkező tünetek, a súlyosabb lefolyás, és az eltérő dominanciájú szervi érintettség különbözteti meg az 1-es típusú hemokromatózistól. A JH igen ritka kórkép, amely egyformán érinti a férfiakat és nőket, és gyorsan progrediáló vasfelhalmozódás jellemzi. A lerakódott vasfelesleg elsődlegesen a szív és a nemi mirigyek funkcióját károsítja, cardiomyopathiát és hypogonadotrop hypogonadizmust okozva. A gyorsan romló keringési funkció késői kezelés esetén vagy kezelés hiányában akár a 30. életév betöltése előtt is halálhoz vezethet (Filali 2004; DeGobbi 2002).

Az elmúlt években vált ismertté, hogy az újonnan azonosított hepcidin és hemojuvelin gének mutációja egyaránt az autoszomális recesszív öröklésmentű JH kialakulásához vezethet (9. táblázat). Az eddigi adatok szerint fenotípusos jellemzők alapján nem különíthető el egymástól a hepcidin, illetve hemojuvelin okozta JH. A kisméretű, négy diszulfid hidat tartalmazó, mikroba-ellenes hatású hepcidin fehérjét kódoló *HAMP* gén több mutációjáról bizonyították, hogy felelős a JH kialakulásáért (Roetto 2003, 2004). A hepcidin fehérje szintje nő a gyulladásos reakció részeként, és a fehérje hatására anémia alakul ki (Weinstein 2002; Nicolas 2002; Nemeth 2003).

A JH másik génjét, a hemojuvelint (*HJV*), a régóta ismert 1q21 kromoszóma régióban klasszikus genetikai térképezés és szekvencia-elemzéssel Papanikolau és mtsai (2004) fedezték fel. Noha a több mint 30 ismert mutáció (Lanzara 2004; Lee 2004) és az egyértelmű genetikai bizonyítékok nem teszik kétségesé, hogy a *HJV* gén autoszomális recesszív öröklésmenetű rendellenessége felelős a JH-esetek többségéért, az újonnan felfedezett fehérje szerkezetéből nem következtethető ki a hemojuvelin vasanyagcserében betöltött szerepének molekuláris mechanizmusa. A viszonylag kis méretű *HJV* gén négy exonból áll, amelyről öt különböző hosszúságú mRNS képződik, amelyek háromféle, fehérjeszintézisre alkalmas szekvenciát tartalmaznak. A leghosszabb, feltehetően keletkező fehérje 426 aminosavból áll (10. ábra).



10. ábra A *HJV* génről alternatív mRNS-hasítással (splicing) képződő különböző szerkezetű mRNS molekulák (felső séma) és a *HJV* gén által kódolt, 426 aminosavból álló fehérje sematikus szerkezete. A séma felső részén levő számok az aminosavak pozícióját jelölik. SP: szignál peptid; RGD: Arg-Gly-Asp szekvenciájú jellegzetes aminosav-szakasz; vWf: von Willebrand faktor D domén; TM: transzmembrán domén (Papanikolau 2004).

A másodlagos szerkezet alapján feltehetően transzmembrán fehérje tartalmaz egy RGD-szakaszt és egy részleges von Willebrand faktor D-domént. A két utóbbi szerkezeti elemnek fehérje-fehérje közötti kölcsönhatásokban lehet szerepe. A hepcidin és a *HJV*

fehérjék feltehetően egyazon szabályozási rendszer részeként működnek, mivel a *HJV* gén eltérése miatt kialakuló JH-ban jelentősen csökkent a vizelet hepcidin szintje (Papanikolau 2004).

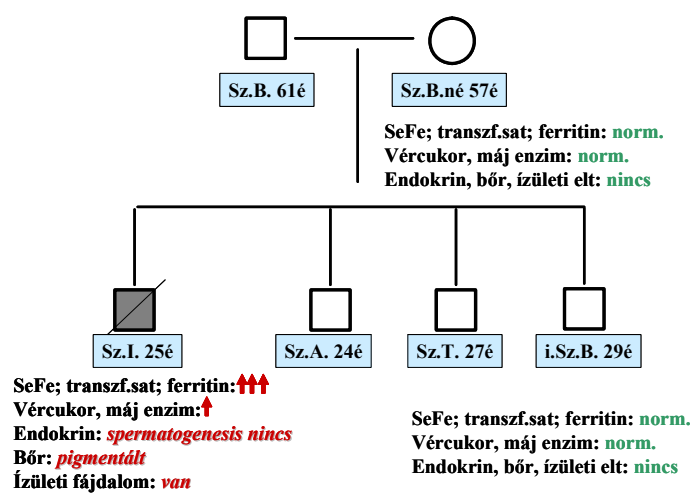
Az általunk vizsgált JH-esetben különleges a kórkép gyors progressziója és halálos kimenetele, valamint a genetikai vizsgálat eredménye. A fiatal erdélyi férfi betegségének fontosabb eseményeit időrendi sorrendben a 10. táblázatban foglaltam össze.

10. táblázat *A juvenilis hemokromatózisban szenvedő férfi kórtörténete időrendi sorrendben.*

Időpont	Kórházi felvétel, tünet/panasz, kezelés
Előzmény	25 éves egészséges, mérsékelt dohányzó, mérsékelt mennyiségű alkoholt fogyasztó, fizikai munkás, negatív családi anamnézissel.
0. nap	Első kórházi felvétel 10 napos mellkasi és gyomortáji fájdalom miatt. Negatív hasi ultrahang (UH) vizsgálat. Kezelés nélkül, javult állapotban távozik.
14. nap	Ismételt kórházi felvétel Hepatológiai Osztályra hasonló fájdalom és hasi duzzanat miatt. Vélemény: akut alkoholos hepatitis, javasolt terápia: alkohol-absztinencia.
26. nap	Ismételt kórházi felvétel mellkasi fájdalom, ezúttal már minimális terhelésre jelentkező légszomj miatt. Hasi UH: máj megnagyobbodás. Labor: májenzim-vércukorszint-emelkedés, vas-paraméter meghatározást nem végeztek. Szív UH: csökkent ejekciós frakció, jobb kamrai fal megvastagodás. Diagnózis: cardiomyopathia, kongesztív szívelégtelenség, toxikus májbetegség akut hepatitisssel. Terápia: digitalis, vízhajtó.
31. nap	48 órával hazabocsátását követően utolsó kórházi felvétel tachycardia, súlyos nehézlégzés miatt. Kóros szív működés, ritmuszavarok, folyamatosan romló szív-paraméterek.
33. nap	Coronarographia, szívizom-biopszia. A biopsziás minta szövettani vizsgálata: súlyos vasfelhalmozódás (Berlini-kék pozitivitás) a szívben. Labor: szélsőségesen emelkedett szérum vas-paraméterek.
36. nap	Súlyos szív-ritmuszavar (kamra-fibrilláció). Exitus letalis.

A progresszió gyorsaságát mutatja, hogy az első kórházi jelentkezés után 5 héttel bekövetkezett a beteg halála, aki korábban nem szedett gyógyszert, nem állt rendszeres orvosi kezelés alatt, és folyamatosan dolgozott. A vasfelhalmozódás egyértelmű diagnózisát a szívizom-biopszia szövettani vizsgálatával állapították meg, de más szervek (máj, hasnyálmirigy, endokrin szervek, bőr) érintettsége is egyértelmű volt. Mivel a

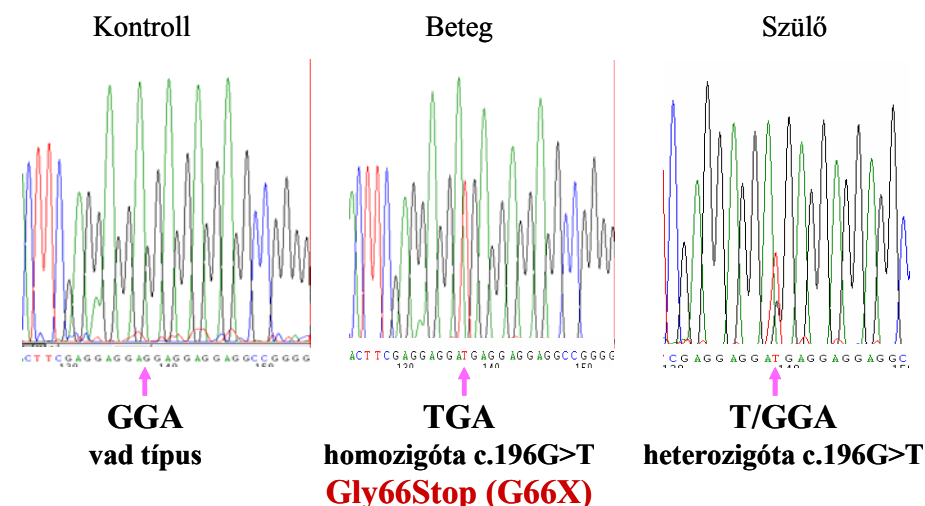
definitív diagnózist csak a szívbetegség igen előrehaladott állapotában sikerült megállapítani, a felmerült szív-transzplantáció nem volt kivitelezhető. Ebben a helyzetben a genetikai vizsgálat jelentőségét a molekuláris szintű diagnózis felállítása és esetleges családvizsgálat képezte. A beteg, két tünet- és panaszmentes testvér valamint az anya néhány laboratóriumi és fizikális vizsgálati eredményét mutatja az alábbi családfa (11. ábra), amely recesszív öröklésmenetet valószínűsít.



11. ábra Családfa és fenotípusos jellemzők. Jelmagyarázat: négyzet: férfi; kör: nő; üres négyzet/kör: egészséges; szírozott: érintett; áthúzott: meghalt. A felfelé mutató vastag nyíl kórosan emelkedett szintet jelez.

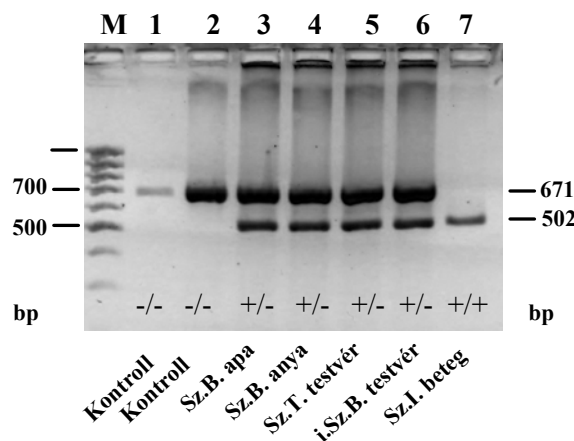
A genetikai vizsgálat részeként a betegnél meghatároztuk a *HFE* (az 1-es típusú hemokromatózis) genotípust, ami vad típust mutatott mindkét gyakori mutáció szempontjából. Mivel a fiatalkori manifesztáció, a kiemelkedő súlyosság és az elsődleges szív-érintettség a JH mellett szólt, párhuzamosan végeztünk közvetlen szekvencia-elemzést a *hepcidin* (*HAMP*) és a *HJV* géneket vizsgálva. A *HAMP* gén szekvenciájában nem találtunk eltérést. Ezzel szemben, ahogy a ábrán látható a hemojuvelin gén 3. exonjában egy trinukleotid ismétlődés közepén egy egyetlen bázist érintő szubsztitúciót (c.196G>T) észleltünk a betegnél homozigóta (piros csúcs a fekete csúcs helyett), míg tünetmentes édesanyjánál heterozigóta (az ábrán egymásra vetülő piros, illetve fekete csúcsok) formában (12. ábra). A számítógépes kiértékelés és a leolvasási keret illesztése után kiderült, hogy ez a bázis-szubsztitúció a fehérjelánc 66. glicin aminosavának stop kodonra

való cserélődéséhez (G66X) vezet. Ennek alapján a mutáció következményeként egy jelentős mértékben csökkent fehérje keletkezése jósolható a fehérjelánc mintegy 85%-ának elvesztésével. Ez egyértelműen betegség-oka mutációt jelent. A *HJV* gén fennmaradó kódoló és mRNS-hasítási (splicing) régiói egységesen vad típusú szekvenciát mutattak, azaz csak a fenti eltérés állhat a kóros fenotípus hátterében.



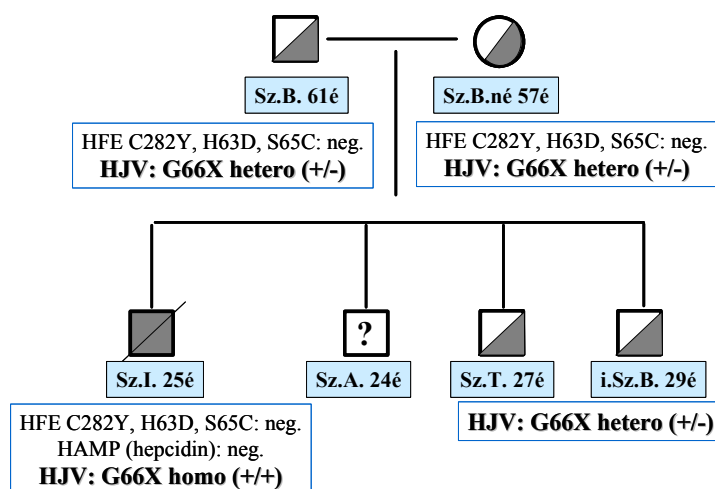
12. ábra A *HJV* gén 3. exon egy szakasza közvetlen szekvencia-elemzésének eredménye. Az ábra a 3. exon egy rövid, az elváltozást tartalmazó szakaszának dideoxi-láncterminációs technikával végzett vizsgálatának regisztrátumát és a kiértékelés eredményét mutatja egy kontroll, a beteg, és édesanyja mintájának összehasonlításával. Az általánosan használt szín-kód: piros=T (timin); fekete=G (guanin); zöld=A (adenin); kék=C (citozin).

Az eredmény megerősítését egy célzottan erre az esetre tervezett PCR-RFLP módszerrel is elvégeztük (13. ábra), amelyben azt a körülményt használtuk ki, hogy a mutáció hatására egy *FokI* restrikciós hasítási hely jelenik meg a DNS-szekvenciában. Ez a hasítási hely nincs jelen a vad típusú szekvenciában. Ezenfelül egy mutáció-független hasítási helyet is tartalmaz a PCR-termék. Így az emésztett vad típusú minta esetében egy 671 bp, heterozigóta hordozó minta esetében két, 671 + 502 bp, homozigóta mutáns esetben pedig csak egy 502 bp méretű DNS-fragmentumot látunk.



13. ábra Az érintett és családtagjai esetében végzett PCR-RFLP vizsgálat eredménye a HJV gén G66X pontmutációjának kimutatása céljából. Az ábra az agaróz gél-elektroforézis képét mutatja. M: méretmarker; 1. és 2. vad típusú minták; 3-6 heterozigóta családtagok; 7. homozigóta mutáns. A jobb oldalon a két specifikus DNS-fragmentum mérete látható bázispár (bp) dimenzióban.

A genetikai családvizsgálat eredményeit a 14. ábrán bemutatott családfa foglalja össze. A beteg mindkét szülője, és további két testvére heterozigóta hordozónak bizonyult, a harmadik fiútestvértől nem kaptunk mintát.



14. ábra A genetikai vizsgálatok eredményeinek összefoglalása a családfa kontextusában. Jelmagyarázat: lásd a ábrát; felerészben satírozott kör/négyszög: heterozigóta hordozó.

A kapott eredmények összhangban vannak a JH autoszomális recesszív öröklésmenetével, amennyiben csak mindkét allél DNS-eltérése (homozigóta státusz) esetén alakul ki a betegség, egy allél érintettsége (heterozigóta státusz) esetén tünetmentes hordozói állapot áll fenn. A különleges, várhatóan szélsőségesen ritka heterozigóta mutáció

előfordulása a kis erdélyi faluból származó mindkét szülőnél felveti az esetleges távoli vérrokonság lehetőségét. Ebből a meggondolásból érdekes lenne további, célzott genetikai vizsgálatok elvégzése a szűkebb földrajzi régióban élő csoportnál, az esetleges további *HJV* G66X mutáció-hordozó személyek azonosítása céljából.

Az újonnan leírt G66X mutáció a közlés időpontjában rendelkezésre álló ismeretek szerint a legközelebb helyezkedik el a gén 5' végéhez, azaz a fehérje átíródás kezdetét jelző ATG-kodonhoz. Az egy bázist érintő csere a *HJV* gén 3. exonjában található, az alternatív, rövidebb fehérjelánc-kezdő aminosavat kódoló triplettől 5' irányban, azaz a gén kezdete felé található. A homozigóta mutáns betegnél a 3' irányban eltérést nem tartalmazó génszakaszról keletkezhet bármelyik, Papanikolau és mtsai (2004) által feltételezett alternatív, kisebb méretű fehérjelánc (lásd ábra), csak a teljes, 426 aminosav nagyságú fehérje keletkezése gátolt. Ezeket a körülményeket figyelembe véve megállapítható, hogy ha keletkeznek is kisebb méretű fehérjeláncok a leírt alternatív mRNS változatokról, azok nem képesek a *HJV* fehérje eredeti funkcióját ellátni. Összefoglalva, egy ritka, kiemelkedő súlyosságú kórképben, a JH-ban elhunyt betegnél egy új mutációt fedeztünk fel a *HJV* génben, amely különleges elhelyezkedése miatt új információt szolgáltat a feltételezett alternatív fehérje termékek lehetséges szerepére vonatkozóan.

III.2. GENETIKAI KOCKÁZATI TÉNYEZŐK POPULÁCIÓS VIZSGÁLATAI

III.2.1. Egyes típusú örökletes hemokromatózis

A progresszív vasfelhalmozódással járó 1-es típusú („klasszikus”) örökletes hemokromatózis klinikai tünetei leggyakrabban 40-60 éves életkorban lappangva jelentkeznek (Witte 1996). Valamennyi szervi manifesztáció háttérében a szövetekben kialakuló kóros vasfelhalmozódás és a következményes funkció-károsodás áll. A

hemokromatózis legtöbb tünete nem specifikus. A betegség korai szakaszában a betegek gyakran krónikus fáradtságról, gyengeségről, hasi és ízületi fájdalmakról, impotenciáról panaszkodnak. A lappangó kezdetet jellemzi, hogy a tünetek megjelenése és a diagnózis felállítása között eltelt idő nőknél átlagosan öt, férfiaknál nyolc év (Adams 1991; Niederau 1996). A klasszikus klinikai triász a bronz-diabetesszel járó májcirrhosis a betegség késői szakaszára jellemző.

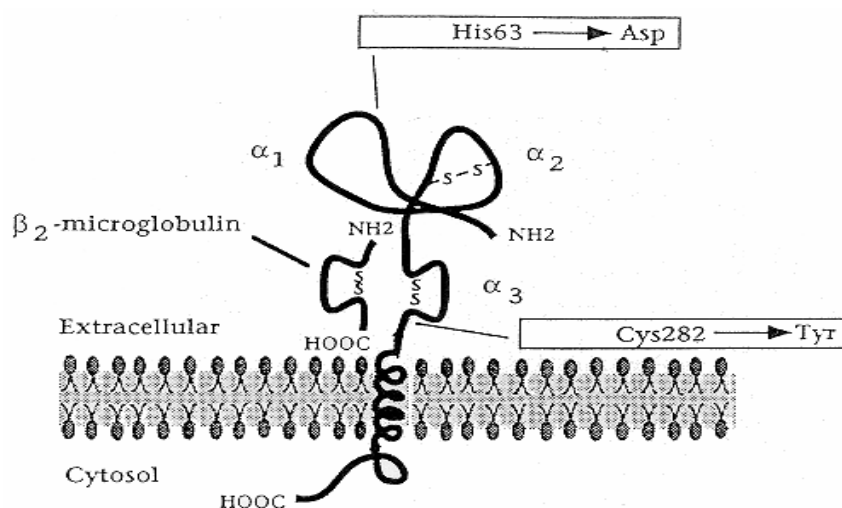
A májkárosodás a kórkép egyik legállandóbb jellemzője (Adams 2000). A vaslerakódás főként a hepatocitákat érinti és ugyanakkor jellemző a viszonylag kis mértékű vasfelhalmozódás a reticuloendothelialis rendszerhez tartozó makrofágokban (Kupffer-sejtek). A vaslerakódás fokozódásával először fibrosis, majd cirrhosis alakul ki. Klinikai vizsgálattal máj-megnagyobbodás a betegek több, mint 90%-ánál észlelhető. A májenzimek közül enyhe aminotranszferáz-szint emelkedés gyakran megfigyelhető. A máj-érintettség legsúlyosabb szövődménye a hepatocelluláris karcinóma, amely a fibrosissal és cirrhosisal szövődött hemokromatózisos esetek mintegy 20-30%-ában alakul ki (Niederau 1985).

A krónikus vasterhelés szintén károsítja a hasnyálmirigy szigetsejtjeit, amelynek első megnyilvánulása az inzulin-rezisztencia kialakulása. Diabetes mellitus a hemokromatózisban szenvedő betegek 65%-ánál, főként a cukorbetegség szempontjából pozitív családi anamnézisűeknél és a májcirrhosisban szenvedőknél alakul ki. Szintén jellemző az ízületi érintettség, amely a lerakódó vas által okozott csont- és porckárosodásokban nyilvánul meg. Panaszokat okozó arthropathia a betegek 25-50%-ánál alakul ki, és általában 50 év felett jelentkezik, de a kórlefolyás bármely szakaszában megjelenhet, akár a betegség első tünete is lehet. A leggyakoribb szívet érintő manifesztáció a dilatatív cardiomyopathia és az ingerületvezetési zavarok. A pajzsmirigyben, a mellékpajzsmirigyekben, a hipofízis elülső lebenyében és a mellékvesék

zona glomerulosájában szintén kifejezett vaslerakódás figyelhető meg, amely változatos endokrin funkció-zavarokat okozhat (Adams 1991).

A specifikus tünetek hiánya és a lappangó kezdet miatt a hemokromatózis diagnózisának megállapítása sokszor okoz nehézséget (Adams 2000). A diagnózis alappillére a szérum vas-, illetve ferritin-szintek és a transferrin-telítettség (szaturáció) meghatározása. A transferrin-szaturáció mérése jobban megfelel szűrővizsgálat céljára, nőknél 50% feletti, férfiaknál 62% feletti érték jellemző a hemokromatózusra. A kórkép genetikai alapjainak megismerése révén napjainkra a HFE genotípus-meghatározás is a rutin diagnosztikai egyik eszközévé vált.

Évtizedek óta ismert volt a primer (idiopathiás) hemokromatózis monogén, autoszomális recesszív öröklésmenete és HLA-kapcsoltsága (Simon 1976). A kórkép kialakulásáért felelős gén felfedezése azonban csak 1996-ban történt meg (Feder 1996). A 6. kromoszóma rövid karján (6p22.1), a HLA-A antigént kódoló régió közelében található, *HFE* elnevezésű gén C282Y pontmutációja a vizsgált hemokromatózisos betegek 83%-ánál homozigóta formában fordult elő, míg a kontrollok egyike sem volt homozigóta. A báziscsere (c.845G>A) következtében a *HFE* gén által kódolt fehérje 282. cisztein aminosava tirozinra cserélődik. A HFE fehérje aminosav sorrendje alapján az MHC I. osztályba tartozó fehérjékkel mutat rokonságot: egy transzmembrán régióval, és három, az MHC fehérjék $\alpha 1$, $\alpha 2$ és $\alpha 3$ doménjeivel analóg extracelluláris doménnel rendelkezik (15. ábra). A fehérje fontos jellemzője az a négy cisztein aminosav, amelyek az $\alpha 2$ és az $\alpha 3$ domének diszulfid hídjait alkotják. A C282Y aminosavcsere következtében nem jöhet létre a normál fehérjeszerkezet kialakulásához nélkülözhetetlen diszulfid-híd, ami a fehérje korai, sejten belüli degradációjához és homozigóta C282Y mutáció esetén hiányzó sejtfelszíni HFE-expresszióhoz vezet (Waheed 1997; Feder 1997).



15. ábra A HFE gén által kódolt fehérje feltételezett szerkezete (Feder 1996)

A C282Y mutáció mellett egy másik aminosavcserével járó variánst is (c.187C>G) is találtak, amelynek jelenlétében a 63. hisztidin aminosav aszparaginsavra cserélődik (H63D). A H63D variáns a hemokromatózisban szenvedő C282Y-heterozigóta betegek C282Y mutációt nem hordozó kromoszómáján 89%-ban volt kimutatható, szemben a kontroll kromoszómákra jellemző 17%-os gyakorisággal. Ezek a megfigyelések arra utaltak, hogy a kettős (kombinált) heterozigóta (C282Y és H63D) állapot növeli a hemokromatózis kialakulásának esélyét; míg önmagában a H63D mutáció nem okoz hemokromatózist (Feder 1996).

Az első felfedezést később több munkacsoport vizsgálatai is megerősítették. Valamennyi tanulmány a HFE C282Y-homozigóta státusz gyakori (64-100%-os) előfordulását igazolta hemokromatózisban szenvedő kaukázusi betegpopulációkban (Beutler 1996; Borot 1997; Carella 1997; Jazwinska 1996; Jouanolle 1996). Ugyanakkor ellentmondásos a szakirodalom álláspontja a HFE gén C282Y-homozigóta genotípusának penetranciáját illetően, azaz abban, hogy 100, véletlenszerűen kiválasztott C282Y-homozigóta személy közül a megfelelő életkorban hány személynél alakul ki tüneteket okozó hemokromatózis. Néhány évvel ezelőtt a C282Y mutáció még közel 100%-os penetranciáját valószínűsítették (Shaheen 19989), az újabban elvégzett populációs és

családvizsgálatok adatai alapján viszont a C282Y mutáció penetranciáját 10-25% közé (Ajioka 2003) vagy akár 1% alá teszik (Beutler 2002; 2003). A kisebb penetrancia a környezeti hatások, vagy más genetikai tényezők jelentős szerepére utalhat. Gyakorlati következmény, hogy tünetmentes (pl. családvizsgálattal azonosított) C282Y-homozigóta személyeknél a rutinszerű genetikai vizsgálatokból csak valószínűség-jellegű következtetéseket lehet levonni.

Már a betegpopulációk vizsgálata során egyértelművé vált, hogy észak-európai eredetű hemokromatózisos betegeknel nagyobb gyakorisággal fordul elő a mutáció, mint dél-európai populációkban (Carella 1997; Bomford 2002). Szintén fontos megfigyelés volt, hogy a HFE C282Y mutációja a normál populációban is 1-10% allél-frekvenciával fordul elő, amely 2-19%-os heterozigóta és 0,1-1%-os homozigóta aránynak felel meg. Merryweather-Clarke és mtsai (1997) számos etnikai csoportban, összesen 2978 normál személynel vizsgálták a C282Y mutáció gyakoriságát. Azokban a populációkban találtak magas C282Y allél-frekvenciát, ahol az öröklődő hemokromatózis is gyakori, míg azoknál az etnikai csoportoknál, ahonnan eddig a betegség kisebb előfordulási gyakoriságáról számoltak be, a C282Y allél-frekvencia is alacsonyabbnak bizonyult. A legmagasabb előfordulási gyakoriságot az írországi populációban mérték. Az afrikai, az ázsiai és az ausztráliai bennszülött kromoszómákon a mutáció gyakorlatilag nem fordult elő. A szerzők azt feltételezték, hogy a mutáció a kelta eredetű népcsoport egy tagjában keletkezett („founder effect”), és ennek megfelelően az allél-frekvencia Európában nyugatról keletre és északról délre csökkenő tendenciát mutat (Merryweather-Clarke 1997). A C282Y variáns gén magas allél-frekvenciájának oka nem ismert. Feltételezhető, hogy a mutáció jelenléte szelektív előny jelentett, mivel az védelmül szolgálhatott a régebbi eltérő étrenddel járó vashiány ellen.

A HFE genetikai variánsainak jelentős gyakorisága és az esetleges populációs különbségek indokoltá tették, hogy meghatározzuk a HFE C282Y és H63D pontmutációk magyarországi átlagpopulációra jellemző allél-frekvenciáját. Első, 277 nem rokoni kapcsolatban álló személyből álló kontroll csoportunk az Országos Haematológiai és Immunológiai Intézetben HLA-tipizálás, illetve egyéb DNS vizsgálatok résztvevőiből tevődött össze (intézeti dolgozók, csontvelő donorok, apasági vizsgálat résztvevői) az ország egész területéről, de főként Budapestről. Újszerű PCR-RFLP módszert is alkalmazva ebben a csoportban a C282Y mutációra nézve 31 heterozigóta (11,2%) személyt találtunk. Az 554 allélből 31 volt pozitív, ez $5,6 \pm 2,0\%$ -os C282Y allél-frekvenciának ($\pm 95\%$ -os megbízhatósági tartomány, CI) felel meg. Eredményünk meglepően magasnak bizonyult, és a németországi gyakorisághoz hasonló tartományba helyezte hazánkat (Nielsen 1998). Ezzel elsőként szolgáltatunk adatot a közép európai régióból, és az észlelt magas allél-frekvencia alapján megkérdőjeleződött a C282Y mutáció-gyakoriság nyugat-keleti tendenciózus csökkenése (**6. cikk**).

Méréseink és a nemzetközi irodalom alapján indokolt volt a diagnosztikai célú mutáció-vizsgálatok megkezdése, hiszen ezzel a vasfelhalmozódás korai szakában, akár a tünetek megjelenése előtt (preszimptomatikus stádiumban) is kimutatható a hemokromatózis (**7. cikk**). Az értekezés készítésének időpontjáig összesített adatok szerint 464 hemokromatózis klinikai gyanúja miatt vizsgált személynél végeztünk C282Y mutáció-kimutatást kezdetben PCR-RFLP technikával, az utóbbi két évben pedig valós idejű PCR-rel történő genotipizálással. 28 C282Y-homozigóta és 21 C282Y/H63D kettős heterozigóta beteget azonosítottunk.

A 28 azonosított homozigóta genotípusú személy közül 18 esetben álltak rendelkezésünkre klinikai adatok (11. táblázat). A C282Y-homozigóta férfiak 78%-ánál májérintettség, 44%-uknál pedig májcirrhosis volt kimutatható.

11. táblázat A C282Y homozigóta betegcsoport egy részének klinikai paramétereit

Sor-sz.	Nem	Kor (év)	Diagnóziskor fennálló tünetek	se Fe (μmol/l)	Ferritin (μg/l)	TS (%)	AST/ALT (U/l)	Máj-biopszia
1.	Ffi	20	Panaszmentes, pozitív családi anamnézis	17	169	31	23/42	n.k.
2.	Ffi	24	Fáradékonyság	30	617	78	23/29	poz.
3.	Ffi	34	Fáradékonyság, hepatomegalia, arthropathia	43	-	70	47/95	poz.
4.	Ffi	37	Hepatomegalia	43	-	77	31/35	poz.
5.	Ffi	54	Cirrhosis, IGT	49	8000	115	65/86	poz.
6.	Ffi	55	Májenzim-eltérések	41	312	98	29/55	n.k.
7.	Ffi	58	Cirrhosis, arthropathia, IGT, bőrpigmentáció	34	-	74	68/59	poz.
8.	Ffi	61	Cirrhosis	26	3000	97	43/41	poz.
9.	Ffi	66	Cirrhosis, DM	23	4330	47	170/200	poz.
10.	Nő	14	Fáradékonyság	35	219		35/30	n.k.
11.	Nő	21	Fáradékonyság	44	142	71	18/10	n.k.
12.	Nő	25	Panaszmentes	35	164	47	20/17	n.k.
13.	Nő	26	-	-	-	-	-	poz.
14.	Nő	27	Panaszmentes	32	20	46	28/-	n.k.
15.	Nő	43	Panaszmentes	-	370	68	-	poz.
16.	Nő	47	Hepatomegalia	-	840	74	-	poz.
17.	Nő	61	Hepatomegalia, arthropathia	35	808	74	68/85	n.k.
18.	Nő	70	Arthropathia	34	2050	71	42/53	poz.

Rövidítések: ffi: férfi, se Fe: szérumszén, TS: transzferrin-szaturáció, IGT: impaired glucose tolerance (csökkent glükóz tolerancia), DM: diabetes mellitus, n.k.: nem készült, poz.: pozitív. **Referencia tartományok:** se Fe: 14-27 μmol/l, szérumszén: 20-200 μg/l, TS: 20-55%, AST: 5-35 U/l, ALT: 5-40 U/l. A vastagon szedett karakterek kóros eltéréseket jeleznek.

Nőknél máj-érintettség csak a betegek 60%-ánál volt észlelhető, cirrhosis pedig nem fordult elő. A C282Y-homozigóta csoportban, 11 esetben végeztek májbiopsziát, és a szövettani kép minden esetben hemokromatózist igazolt. A C282Y-homozigóta betegek szérumszén szintje az esetek 80%-ában, a szérumszén szintje a betegek 71%-ánál, a transzferrin-szaturáció pedig 88%-uknál volt kórosan emelkedett.

12. táblázat: C282Y/H63D kettős heterozigóta személyek klinikai adatai

Sor-sz.	Nem	Kor (év)	Diagnóziskor fennálló tünetek	se Fe (μmol/l)	Ferritin (μg/l)	TS (%)	AST/ALT (U/l)	Máj-biopszia
1.	ffi	20	Se Fe emelkedés	46	72	93	17/20	n.k.
2.	ffi	32	Poz. családi anamnézis	18	115	33	40/68	n.k.
3.	ffi	32	Poz. családi anamnézis	28	42	21	20/21	n.k.
4.	ffi	56	Poz. családi anamnézis	24	409	42	21/19	n.k.
5.	ffi	63	Myelodysplasiás szindróma	43	1230	64	28/44	n.k.
6.	nő	22	Se Fe emelkedés, allergia	26	31	41	25/24	n.k.
7.	nő	28	Poz. családi anamnézis	15	152	29	17/19	n.k.
8.	nő	30	Poz. családi anamnézis	29	52	49	14/13	n.k.
9.	nő	40	Se Fe emelkedés, kardiális érintettség	-	151	-	21/22	n.k.
10.	nő	52	Poz. családi anamnézis	29	256	37	22/22	n.k.
11.	nő	59	Se Fe emelkedés	24	287	29	35/23	poz.

A rövidítéseket és a referencia tartományokat lásd a 11. táblázatnál.

A 21 kettős heterozigóta személy közül 11 esetben kaptunk klinikai adatokat (12. táblázat). A kettős heterozigóta személyek 60%-ánál hemokromatózis szempontjából pozitív családi anamnézis miatt, és 40%-uknál véletlenszerűen, egyéb klinikai tünetek kivizsgálása során észlelt emelkedett szérumsavas szint miatt kérték a genetikai vizsgálatot. Enyhe májenzim-emelkedés 20%-ban fordult elő. A szérumsavas szint a kettős heterozigóta betegek 40%-ánál, a szérumsav-ferritin-szint 36%-uknál, a transferrin-szaturáció pedig 18%-uknál volt emelkedett.

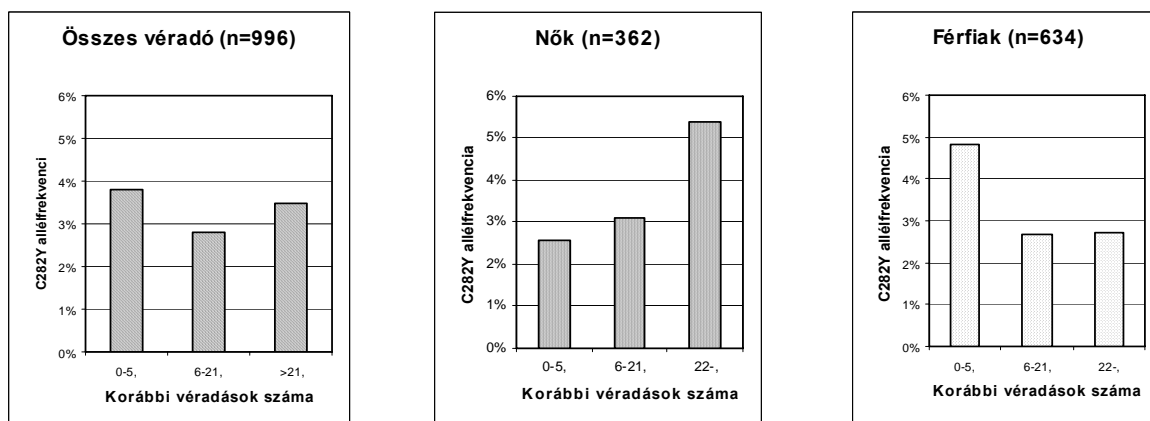
Más kutatócsoportok kérdésfeltevésével párhuzamosan (Bell 1997) a hemokromatózis populációs aspektusait tovább vizsgáltuk egy jelentős esetszámú, véradóknál végzett genetikai szűrővizsgálat keretében. Alapkérdésünk az volt, hogy kimutatható-e gyakorisági különbség a *HFE*-mutációkat illetően a különböző számú véradáson részt vett egészséges véradók alcsoportjai között, másként fogalmazva: jelenthet-e védelmet a *HFE*-mutáció(k)

jelenléte az ismételt véradások során felmerülő vasvesztéssel szemben. A munka másik célkitűzése egy jelentős számú, egészséges magyar referencia-populáció mintáinak összegyűjtése volt, amely kontrollként szolgálhat különböző genetikai variánsok gyakorisági mérései során. Szintén fontos kérdés volt, hogy a kezdetben vizsgált kontroll csoportunktól teljes mértékben eltérő forrásból származó, kellően nagy létszámú csoportnál mért adatok megerősítik-e korábbi, viszonylag váratlan megfigyeléseinket a hazai C282Y allél-frekvenciáról.

A budapesti és a szegedi régiókból összegyűjtött egészséges véradó csoportban ($n=996$) egy C282Y-homozigóta (0,1%) és 65 heterozigóta (6,5%) személyt azonosítottunk. A C282Y allél-frekvencia $3,4 \pm 0,8\%$ volt. Nem találtunk szignifikáns C282Y allél-frekvencia eltérést a nők és a férfiak ($3,5 \pm 1,4\%$, illetve $3,3 \pm 1,0\%$), illetve a budapesti és a szegedi populáció között ($3,4 \pm 1,0\%$, illetve $3,3 \pm 1,5\%$). Az első vizsgálat kontroll csoportjában a C282Y allél-frekvencia meglepően magasnak ($5,6 \pm 2,0\%$) bizonyult (**6. cikk**). A teljes véradó csoport és az eredeti kontroll csoportunk C282Y allél-frekvencia értékei között szignifikáns mértékűnek bizonyult a különbség ($p=0,015$). A véradó csoportban talált C282Y allél-frekvencia alacsonyabb a nyugat-európai országokból közölt értékeknél, viszont magasabb, mint a kelet-magyarországi allél-frekvencia (Szakonyi 1999). Az említett eltérések pontos okát nem ismerjük, ugyanakkor arra irányítják a figyelmet, hogy nagy óvatossággal és mértéktartással kell a következtetéseket levonni a genetikai tényezők populációs vizsgálataiban során.

Több tanulmányban is kimutatták, hogy a *HFE*-variánsokra heterozigóta személyek vasparaméterei kismértékben emelkedettek a normál genotípusú személyekhez képest, és a vashiányos anaemia gyakorisága is alacsonyabb az egyszerű és a kettős C282Y/H63D heterozigóta nők esetében (Bulaj 1996; Adams 1994; Whitfield 2000). Kiindulási hipotézisünk az volt, hogy a sokszoros véradások során esetleg fellépő vashiánnyal

szemben is védő szerepet játszhatnak a *HFE*-mutációk. Ennek vizsgálatára összefüggéseket kerestünk a véradó-csoportban a korábbi véradások száma és a C282Y allél-frekvencia értékek között. A korábbi véradások száma alapján a következő három csoportba soroltuk a véradókat: I. csoport: 0-5 (n=343); II. csoport: 6-21 (n=338); III. csoport: 21-nél több korábbi véradás (n=315). A határértékeket úgy igyekeztünk megválasztani, hogy egy minimális, egy közepes és egy nagymértékű vasvesztésnek kitett csoportot kapjunk. Az összehasonlító elemzések eredményeit a 16. ábra szemlélteti. A C282Y allél-frekvencia $3,8 \pm 1,5\%$ volt az I., $2,8 \pm 1,3\%$ a II. és $3,5 \pm 1,5\%$ a III. csoportban. A női véradók között a véradások számának a növekedésével párhuzamosan megfigyelhető a C282Y allél-frekvencia növekedése ($2,6 \pm 1,8\%$, $3,1 \pm 2,3\%$, illetve $5,4 \pm 3,3\%$), ez eltérés azonban nem éri el a szignifikáns mértéket. Ugyanez a C282Y allél-frekvencia növekedési tendencia nem volt megfigyelhető a férfi véradók között ($4,8 \pm 2,2\%$, $2,7 \pm 1,5\%$, illetve $2,7 \pm 1,5\%$).



16. ábra A C282Y allél-frekvencia és a korábbi véradások számának összefüggése az összes véradónál (bal oldal), nőknél (közép), illetve férfiaknál (jobb oldal) három, a korábbi véradások száma szerinti csoportosítás esetén.

Vizsgálatainkkal tehát nem igazolódott kiindulási feltételezésünk, hogy a *HFE* C282Y allél-frekvencia emelkedhet a korábbi véradások számának növekedésével párhuzamosan. Előfordulhat, hogy a vasban gazdag táplálkozás, valamint a multi-vitamin és nyomelem

készítmények rendszeres fogyasztásának elterjedésével a C282Y-mutáció vashiánnyal szembeni védő szerepének jelentősége csökkent, s e miatt nem sikerült kimutatnunk az allél-frekvencia emelkedést a többszörös véradók között. Lehetséges azonban az is, hogy az évi 1-2-szeres vagy ennél ritkább véradás nem jelent nagyobb fokú vasvesztést a szervezet számára, és a *HFE*-mutációk védő szerepe csak az ennél nagyobb mértékű vasvesztésnél érvényesülhetett szelekciós tényezőként. Erre utalhat a nők körében észlelt allél-frekvencia emelkedés tendenciája is, hiszen a nők a menstruáció miatt több vasat vesztenek a férfiaknál.

Összefoglalásként megállapítható, hogy elsőként végeztünk populációgenetikai vizsgálatokat az 1-es típusú örökletes hemokromatózis *HFE* génje szempontjából a hazai átlagpopulációban, és a vártnál magasabb C282Y allél-frekvenciát állapítottunk meg (**6. cikk**). Megkezdjük, és folyamatosan végzünk *HFE* mutáció-kimutatást hemokromatózis gyanújával rendelkező betegeknél (**7. cikk**). Sikeresen kivitelezünk egy nagy esetszámú genetikai szűrővizsgálatot véradók körében. A *HFE* C282Y genotipizálási eredmények nem utaltak arra, hogy a *HFE*-mutáció státusz jelentősen befolyásolná a véradás során fellépő vasvesztés kialakulásának kockázatát (**8. cikk**). A szűrővizsgálat keretében összegyűjtött, egészséges véradóktól származó DNS-mintákat a későbbiekben hazai együttműködés keretében több genetikai asszociációs tanulmányhoz használtuk referencia-csoportként (lásd a **13., 14., 16., 17. cikkeket**).

III.2.2. Egyes típusú örökletes hemokromatózis és myelodysplasia

A myelodysplasiás szindróma (MDS) a haematopoetikus őssejtek klonális betegsége, amelyben kóros, ineffektív erythropoiesis és myelopoiesis figyelhető meg. Az idősebb életkorban egyre nagyobb valószínűséggel kialakuló betegségekre jellemző a myeloid leukémiás transzformációra való hajlam. Az MDS-ben szenvedő betegek a vérképzési zavar súlyosságától függően több alcsoportba sorolhatók: refrakter anaemia (RA), refrakter

anaemia gyűrűs sideroblastokkal (RARS) és refrakter anaemia emelkedett blaszt-számmal (RAEB). A kezdeti panasz általában az anaemiával összefüggő gyengeség és fáradékonyság, ritkábban vérzés, illetve fertőzéssel összefüggő láz. A betegségre napjainkban gyakorlatilag csak tüneti kezelést alkalmaznak. A sorozatos vérátömlesztések nyomán folyamatosan növekszik a vérkészítmények iránti igény, amely a szerológiai inkompatibilitás kialakulásával magyarázható.

Az MDS tünetegyüttesének jellemző része a progresszív vasfelhalmozódás (haemosiderosis), amelynek hátterében elsődlegesen az ineffektív erythropoiesis és az ismételt, növekvő gyakoriságú transfúziók állnak, de egyéb szerzett, illetve örökletes tényezők szerepe is feltételezhető. Gatterman és mtsai (2000) a mitokondriális vasanyagcserét, a vas transzportot és az ATP szintézist érintő, szerzett mitokondriális DNS mutációk esetleges szerepét vetették fel. A *HFE* vasfelhalmozódásra hajlamosító gyakori mutációi szintén súlyosbíthatják a vaslerakódást MDS-ben. A vasterhelés a kóros szabályozású sejtklónra visszahatva, pl. szabadgyökök generálásával, mutációk előidézésével tovább súlyosbíthatja az alapbetegség progresszióját (Halliwell 1990; Loeb 1988). Klinikai megfigyelések szerint az orális vas-kelátor kezelés bevezetése már a korai szakban csökkenti a transfúziók gyakoriságát (Beutler 2003). A vasfelhalmozódás iránti genetikai hajlam lehetséges szerepének vizsgálatára irányuló klasszikus asszociációs tanulmányunk célkitűzése két *HFE*-mutáció gyakoriságának összehasonlítása volt egy MDS-ben szenvedő betegcsoport és a kontroll csoport között.

50 myelodysplasiás szindrómában (MDS) szenvedő beteg C282Y és H63D mutáció analízise során 1 C282Y/H63D kettős heterozigóta, 4 C282Y-heterozigóta, 20 H63D heterozigóta és 1 H63D homozigóta beteget azonosítottunk. A C282Y variáns allél-frekvenciája $5,0 \pm 4,4\%$, a H63D variánsé pedig $23,0 \pm 8,4\%$ volt (13. táblázat).

13. táblázat *A HFE C282Y és H63D mutációinak genetikai vizsgálata MDS-ben szenvedő betegeknél és a véradó kontroll csoportnál*

	MDS-betegek (n=50)	Véradó kontroll (n=80)	p érték
A HFE C282Y pozitív személyek száma n (%)	5 (10%)	4 (5%)	0,732
A HFE H63D pozitív személyek száma n (%)	22 (44%)	21 (26%)	0,055
Valamelyik (C282Y és/vagy H63D) mutációra pozitív személyek száma n (%)	26 (52%)	25 (31%)	0,026

A p érték a Fischer exact teszttel végzett számítás eredménye, a 0,05 alatti értékeket tekintettük szignifikáns mértékűnek.

A C282Y mutációt hordozó személyek aránya nem különbözött szignifikáns mértékben az MDS-ben szenvedő betegek és az első véradók csoportjában (Fischer-féle exact teszt: $p=0,732$; $OR=1,67$ [0,46-6,16]). A H63D mutációt hordozók aránya az MDS-ben szenvedő betegeknél magasabb volt, mint az első véradók csoportjában, azonban a különbség feltehetően az alacsony esetszám miatt nem volt szignifikáns ($p=0,055$). Ugyanakkor a kockázati hányados (OR) érték szerint a H63D mutáció hordozói státusz kockázati tényezőt jelenthet az MDS kialakulása szempontjából ($OR: 2,20$ [1,04-4,66]). Ha a C282Y és a H63D mutációk együttes előfordulását vizsgáltuk a két csoportban, akkor szignifikáns különbséget találtunk: a betegek 52%-a (26/50), míg a véradók csupán 31%-a (25/80) hordozza valamelyik HFE-mutációt ($p=0,026$, $OR: 2,25$ [1,09-4,65]). A bármelyik HFE-mutáció szempontjából pozitív, illetve negatív beteg-alcsoportok kezelés előtti vasparamétereinek (szérum vas és transferrin-szaturáció) összehasonlításakor a mutáció-pozitív csoportban magasabb értékeket mértünk, de valószínűleg a kis esetszám miatt a különbség nem volt szignifikáns mértékű. Mindez arra utal, hogy a HFE gén mutációi akár heterozigóta formában is hozzájárulhatnak az MDS kialakulásához, illetve progressziójához.

A vas a gyorsan osztódó daganatos sejtek számára nélkülözhetetlen elem (Weinberg 1984). Örökletes hemokromatózisban szenvedő betegeknél és egyes tanulmányok szerint már heterozigóta hordozóknál is fokozott lehet egyes daganatos betegségek kialakulásának kockázata (Nelson 1995). A vasfelesleg szabad oxigényökök keletkezését segíti elő, amelyek DNS- és szövetkárosodást okoznak (Halliwell 1990; Nelson 1995). A vaslerakódás, és a *HFE* gén C282Y és H63D mutációi, az említett mechanizmusok révén szerepet játszhatnak az MDS patogenezisében is, gyorsíthatják a betegség progresszióját és elősegíthetik a leukémiás transzformációt. Barton és mtsai (2004) 14 angliai MDS-betegnél végeztek *HFE*-mutációs vizsgálatokat, és a C282Y mutáció csökkent, a H63D mutáció emelkedett gyakoriságát észlelték nem szignifikáns mértékben. A Speletas és mtsai. (2003) által közölt tanulmányban 54 görög, MDS-ben szenvedő betegnél nem észlelték a *HFE*-mutációk nagyobb előfordulási gyakoriságát. A görög tanulmány és saját eredményeink közötti eltérést a két földrajzi régió között a *HFE*-mutációk populációs gyakoriságában kimutatott jelentős különbségek is magyarázhatják.

A vasfelhalmozódás kezelése MDS-ben más vaslerakódással járó anaemiákhoz, pl. a thalassemia kezeléséhez hasonlóan vas-kelátor vegyületekkel (pl. desferoxamin) történik. Jensen és mtsai (1996) 11 MDS-ben szenvedő betegnél követték hosszú távon a vas-kelátor kezelés hatását, és egyértelműen kedvező eredményeket kaptak: nemcsak a transfúziós igény csökkent jelentősen, hanem a vérképzési paraméterek is javultak és lassult a progresszió. További eredmények szintén alátámasztották a vas-kelátor kezelés kedvező hatását, így ez a terápia napjainkra az MDS-kezelés részévé vált (Beutler 2003; Alessandrino 2002; Franchini & Veneri 2004)

Bár vizsgálatunk alacsony esetszáma nem teszi lehetővé egyértelmű általános következtetések levonását, eredményeink arra utalnak, hogy a *HFE* gén mutációi akár

heterozigóta formában is hozzájárulhatnak az MDS kialakulásához, illetve progressziójához.

III.2.3. FV Leiden populációgenetika

A mélyvénás trombózis (MVT) kiemelkedő népegészségügyi jelentőségű betegség, amely idősebb korban elérheti akár az 1:100-as előfordulási gyakoriságot (Seligsohn & Lubetsky 2001) A kórkép lényege a vérárvadási rendszer fokozott aktivitása, amelynek súlyos megnyilvánulási formája a nagyobb vénákban jelentkező kóros alvadékképződés. A legsúlyosabb szövődmény a magas mortalitású tüdő-embólia.

14. táblázat A MVT kockázati tényezői

ÖRÖKLETES	
Gyakori	<ul style="list-style-type: none"> • FV Leiden mutáció (Arg506Gln) • a FII (protrombin) gén promoter szakasz G20210A variáns • a metilén-tetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR) gén Ala C677T variánsa homozigóta formában
Ritka	<ul style="list-style-type: none"> • antitrombin III deficiencia • protein C deficiencia • protein S deficiencia
Igen ritka	<ul style="list-style-type: none"> • diszfibrinogénémia, • homozigóta homocisztinuria
FELTEHETŐEN ÖRÖKLETES	
	<ul style="list-style-type: none"> • emelkedett FVIII, FIX, FXI ill. fibrinogén szintek
SZERZETT	
	<ul style="list-style-type: none"> • műtét vagy sérülés • hosszantartó mozgáshiány • idősebb életkor • malignus betegségek • myeloproliferatív kórképek • korábbi trombózis • terhesség, fogamzásgátlók és hormonpótló kezelés • antifoszfolipid antitestek jelenléte • enyhe/súlyos hiperhomocisztinémia • nem a FV mutációjával összefüggő protein C rezisztencia

A MVT kialakulásában szerzett és örökletes tényezők egyaránt fontos szerepet játszanak. Ezeket a tényezőket tünteti fel a 14. táblázat (Seligsohn & Lubetsky 2001; Martinelli 2001; Olds 2000; Franco & Reitsma 2001).

Nagy visszhangot, és későbbi tanulmányok ezreit tette lehetővé az a közvetlen népegészségügyi jelentőségű felfedezés, hogy az aktivált protein C rezisztencia (Dahlbäck 1993; Koster 1993) jelenségért felelős, a mélyvénás trombózis egyik újonnan felismert örökletes kockázati tényezője, az V. alvadási faktor Leiden mutációja (FV Leiden) heterozigóta formájában mintegy 10%-os előfordulási gyakoriságú egyes kaukázusi csoportokban (Bertina 1994). A mutáció az V. alvadási fehérje génjében egy c.1691G>A szubsztitúció, amelynek következménye az Arg506Gln aminosav csere (Greengard 1994). Az Arg506 aminosav kiemelkedő fontosságú az V. faktor fehérje szerkezetében, hiszen ez az aminosav képezi a protein C enzim egyik hasítási helyét. A protein C funkciója a prokoaguláns kofaktor aktivitású V. faktor fehérje gátlása proteolízis útján (Mann & Kalafatis 2003). Az Arg506 aminosav hiányában nem történik meg a peptidlánc elhasítása, és tartósan fennmarad az aktív V. faktor fehérje. Ennek következtében fokozódik a véralvadási rendszer aktivitása, azaz trombózis hajlam alakul ki. A DNS-eltérés heterozigóta formája enyhébb fenotípusos eltérést, a mélyvénás trombózis kockázatának mintegy 8-szoros emelését okozza, mivel a szervezetben egyszerre van jelen a normális és a kóros szerkezetű V. faktor fehérje. A homozigóta állapot viszont már mintegy 80-szoros MVT kockázattal jár (Koster 1993; Greengard 1994; Ridker 1995).

Már a kezdeti populációs vizsgálatok során fény derült arra, hogy a *FV Leiden* a kaukázusi populációk körében igen gyakori variáns, átlagos európai allél-ferkvenciája 4,4%, ugyanakkor más, nem kaukázusi populációk körében igen kis gyakorisággal mutatható ki (Rees 1995; 1999). Számos asszociációs vizsgálatot is közöltek a gyakori DNS-szerkezeti variáns és különböző kórképek kialakulása (Kontula 1995; Sifontes 1997;

Sanchez 1997), valamint egyéb szerzett tényezők, például orális fogamzásgátlók szedése, vagy terhesség közötti összefüggést keresve (Vandenbroucke 1996; Toglia & Weg 1996).

Tekintve, hogy Magyarországon is gyakori a mélyvénás trombózis, fontos kérdés volt a releváns magyarországi adatok megismerése. Ebben az összefüggésben PCR-RFLP technikával egy 132 személyből álló, vegyes budapesti kontroll populációban (egészséges intézeti dolgozók, csontvelődonorok és apasági vizsgálatok résztvevői) elsőként határoztuk meg az *FV Leiden* magyarországi gyakoriságát (mintegy 10%-os heterozigóta gyakoriság 5,7%-os allél-frekvencia mellett), amely a magasabb tartományba helyezte hazánkat. Saját első vizsgálatunkat mi is kiterjesztettük a véradó kontroll csoportra (171 véradó), és több magyar régióban szintén végeztek átlagpopulációs méréseket. Ezeket az eredményeket összesíti a 15. táblázat.

15. táblázat *A FV Leiden mutáció gyakorisága hazai egészséges populációkban*

Hely	n	Allélfrekvencia (%)	Heterozig. n (%)	Homozig. n	Hivatkozás
Pécs	665	3,6	43 (6,4)	3	Stankovics (1998)
Debrecen	407	4,9	40 (9,8)	0	Balogh (1999)
Bp. (OHII)	171	3,8	11 (6,4)	1	-
Bp. (OHII)	132	5,7	13 (9,8)	1	Tordai (1997) (10. cikk)
Bp. (SOTE I. Női Klin.)	129	3,1	8 (6,2)	--	Nagy (1998)
Összesen:	1504	4,1	115	4	

Jelmagyarázat. n: a vizsgált személyek száma; allél-frekvencia: a pozitív kromoszómák százalékos aránya az összes vizsgált kromoszómához viszonyítva.

Mintegy 1500, feltehetően egészséges (kontroll), több magyar földrajzi régiót reprezentáló személy genotípus adatainak összesítése alapján a valódi hazai allél-frekvencia 4,1%-ra tehető. Ezek alapján indokoltta vált a *FV Leiden*-kimutatás rutinszerű elvégzése érintetteknél és vérrokonainál. A molekuláris genetikai *FV Leiden* genotipizálás saját, és számos más hazai molekuláris laboratórium rutinvizsgálatává vált. Az eredmény

közvetlen hatással van a veszélyeztetett betegek korai (akár a tünetek megjelenése előtti) kiszűrésére, a gyógyszeres kezelés alkalmazására és időtartamára (**10. cikk**).

III.2.4. A valós idejű PCR-es genotipizálás körülményeinek vizsgálata

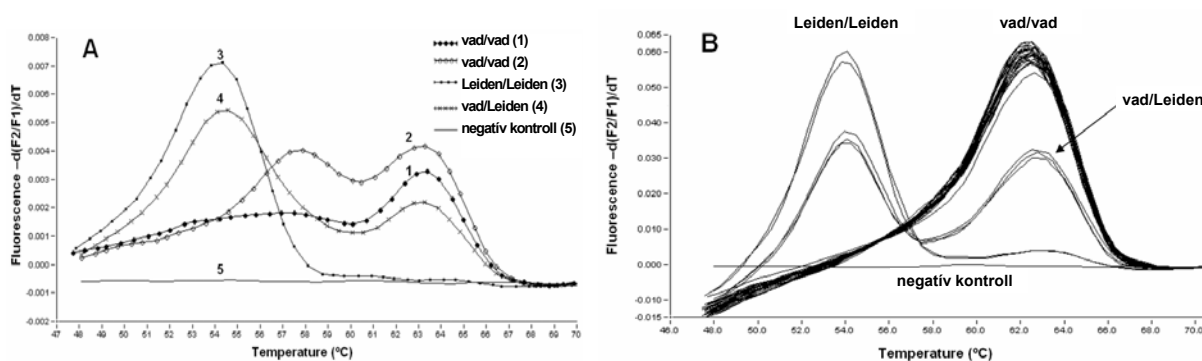
Egy korszerű, valós idejű PCR-készülék, a LightCycler intézeti beszerzése nyomán más fejlesztések mellett lehetőségünk nyílt egy új mutáció-kimutatási módszer, a fluoreszcencia energia rezonancia transzfer (FRET) jelenségen alapuló genotipizálás alkalmazására. Az eljárás lényege, hogy jelöletlen amplifikációs primerekkel végzett PCR-reakciót követően két másik oligonukleotiddal (szonda) végzünk hibridizációt és olvadáspont elemzést. A két hibridizációs oligonukleotid közül az egyik a vizsgálni kívánt variánst tartalmazó DNS-szakaszt ismeri fel, a másik egy szomszédos régiót.

A hibridizáció során a két különböző fluoreszcens festékkel jelölt hibridizációs oligonukleotid fizikai közelségbe kerül egymáshoz, és így az egyik festék megvilágítása hatására kibocsátott energia gerjeszti a szomszédos festékmolekulát, amely esetében változik a fénykibocsátás intenzitása és hullámhossza, Ezt nevezzük FRET-jelenségnek, amelynek segítségével specifikusan és nagy érzékenységgel mutatható ki a keletkezett PCR-termék.

Az olvadáspont elemzés során a készülék lecsökkenti, majd fokozatosan, előre meghatározott sebességgel növeli a minták hőmérsékletét, és méri a leválással párhuzamosan észlelhető fluoreszcencia-változás hőmérséklet-függését. Az alacsony hőmérsékleten valamennyi jelölt oligonukleotid hibridizál (összetapad) a PCR-termékkel, így ebben az állapotban mérjük a maximális fluoreszcenciát. A melegítéssel párhuzamosan csökken a hibridizált, jelölt oligonukleotidok mennyisége, így a mért fluoreszcencia fokozatosan csökken. A csökkenés sebessége és a görbe lefutási tulajdonságai függőséget mutatnak a PCR-termék hibridizációban részt vevő bázissorrendjétől. Egyetlen bázist

érintő változás (mutáció, polimorfizmus) is kimutatható eltérést okoz a hőmérséklet függvényében ábrázolt fluoreszcencia-görbe lefutásában. A könnyebb értelmezhetőség kedvéért a készülék a hőmérséklet függvényében mért fluoreszcencia-értékeket matematikai átalakítás (negatív deriválás) után is ábrázolja. Ebben az ábrázolásmódban az adott hőmérsékleten tapasztalható fluoreszcencia-változás mértékéről (sebességéről) kapunk információt. A fenti adatok és ábrázolás alapján egyértelműen elkülöníthetők a vad típusú, a DNS-eltérést heterozigóta, illetve homozigóta formában tartalmazó DNS-minták. A módszer előnye a hagyományos PCR-RFLP technikához képest a nagyobb érzékenység, és az, hogy a PCR-t követően nincs szükség a munkaigényes gél-elektroforézisre csökkentve ezáltal a PCR-termék kontamináció veszélyét.

Számos, a laboratóriumban korábban PCR-RFLP-vel végzett mutáció-kimutatói módszer helyett a szóban forgó módszert kezdtük alkalmazni. Az általunk tervezett, jelölt hibridizációs oligonukleotidokkal alkalmazási körülményeinek optimalizálása során észleltük az 1:1 aránytól eltérő amplifikációs primerekkel végzett PCR (aszimmetrikus PCR) előnyös hatását.

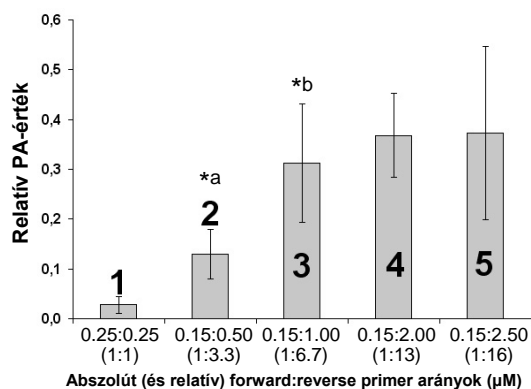


17. ábra Valós idejű PCR-rel végrehajtott FV Leiden genotípusozás, különböző, ismert genotípusú minták, saját tervezésű, 1:1 arányú amplifikációs primerek és hibridizációs oligonukleotidok felhasználásával (A panel), és sorozatvizsgálat aszimmetrikus PCR-rel, 0,15:0,50 μ M (1:3.3) forward:reverse primer arány mellett (B panel). Az ábrán a LightCycler készülékben az olvadáspont elemzés során mért fluoreszcencia értékekből számított, egységnyi hőmérséklet-változásra jutó fluoreszcencia-változások mértékei láthatók az aktuális mintahőmérséklet függvényében. Az „A” paneleken egy vad típusú, két különböző mintázatú heterozigóta, egy homozigóta FV Leiden pozitív minta, valamint a DNS-templát kihagyásával készült negatív kontroll görbék láthatók. A „B” paneleken bemutatott sorozatvizsgálat ábrázolása során az egyes mintázatsorok mellett tüntettük fel a háromféle genotípust, és alul látható a gyakorlatilag egyenes negatív kontroll görbe.

A jelenség részletes jellemzése és a mechanizmus tisztázása céljából szisztematikus vizsgálatokat folytattunk elsőként az aszimmetrikus PCR-rel történő *FV Leiden* meghatározást használva modellrendszerként. Az alábbiakban a szóban forgó témakörben végzett és a **11. cikkben** közölt méréseink eredményeit foglalom össze.

A *FV Leiden* mutáció kimutatása során az általunk tervezett amplifikációs és jelölt hibridizációs oligonukleotidokkal (lásd a Módszerek fejezetet és a **11. cikket**), és egyenlő arányban használt amplifikációs primerek mellett igen alacsony jelintenzitást, és gyakran nem specifikus, szám feletti csúcsokat észleltünk. Ezt a kiindulási állapotot szemlélteti a 17. ábra A panelje. Az eltolt arányban (a reverse primer mennyiségének növelése a forward primerhez viszonyítva) alkalmazott amplifikációs primerek mellett jelentősen, mintegy 8-szoros mértékben nőtt a jelintenzitás (a 17. ábra „A” és „B” paneljén különbözik az „y” tengely skála), és a vad típusú minta esetében az ábra „A” paneljén bemutatott, nem specifikus szám feletti csúcs sem észlelhető. Az egyéb PCR-körülmények, azaz az anellációs hőmérséklet, a magnézium koncentráció, és a hibridizációs oligonukleotidok mennyiségének változtatása hatástalan volt a jelintenzitásra.

Az aszimmetrikus PCR viszonyainak feltérképezése érdekében a *FV Leiden* kimutatási rendszerben szisztematikusan változtattuk az amplifikációs primerek egymáshoz viszonyított arányát az egyéb PCR-körülmények változatlanul hagyása mellett. A különbségek számszerű jellemzéséhez a LightCycler program által automatikusan számított, peak area (PA) elnevezésű paramétert választottuk. Ez a paraméter számszerűen jellemzi a szignál-intenzitást, az esetünkben az összehasonlításhoz használt vad típusú mintára jellemző egy csúcsnál. Az ábrán az összehasonlítások összesített eredményei láthatók. Ahogy a 18. ábrán látható, a reverse primer relatív mennyiségének növelésével párhuzamosan jelentősen nőttek a PA-értékek.

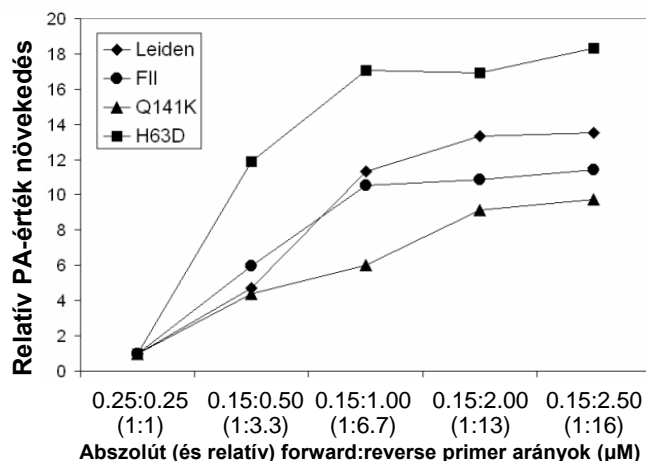


18. ábra A PA-értékek változása a különböző amplifikációs primer arányok függvényében a FV Leiden mutáció kimutatása során. Miközben valamennyi PCR-körülményt változtatlanul hagytunk, az „x” tengelyen µM végkoncentrációban illetve zárójelben abszolút számmal jellemzett eltérő amplifikációs primer arányokat alkalmaztuk, és a LightCycler program által automatikusan számított PA-értékeket ábrázoltuk a három párhuzamos meghatározás átlaga \pm SD formájában. *a szignifikáns ($p=0,014$) különbség az 1-es és 2-es körülmények között; *b szignifikáns ($p=0,035$) különbség a 2-es és a 3-as körülmények között. A többi eltérés nem volt szignifikáns.

Az 1:3,3-as arány esetében az átlagos 0,028-as értékről (1. oszlop) 0,13-ra (2. oszlop), azaz 4,7-szeres mértékben, 1:6,7-es arány esetében pedig az átlagos PA-érték 0,31-re azaz a kiinduláshoz viszonyítva 11,3-szoros mértékben emelkedett. Mindkét változás szignifikáns mértékű volt. A további arány-eltolás további, bár kisebb mértékű PA-érték növekedést okozott (4. és 5. oszlopok). Az 1:16-os aránynál kisebb arány alkalmazása esetén nem észleltünk további növekedést. Vizsgáltuk az amplifikációs primerek mennyiségének változatlan, 1:1 arány melletti növelése (0,15 µM-ról 0,5 µM-ra), és a jelölt hibridizációs oligonukleotidok mennyiségi növelésének (0,25 µM-ról 0,5 µM-ra) hatásait is, de jelentős PA-érték emelkedést nem észleltünk.

Megfigyeléseinket további, egy bázist érintő szekvencia-eltérésekre is kiterjesztettük, és a fenti primer-arány változtatások hatását a következő három mutáció-kimutatói rendszerben vizsgáltuk: a mélyvénás trombózis örökletes kockázati tényezője, a II. alvadási faktor gén szerkezeti variánsa, az *FII* g.20210G>A (von Ahsen 1999) az 1. típusú hemokromatózis génjének szekvencia-variánsa, a *HFE* H63D (Tag 2001), és egy ABC-transzporter gén szerkezeti variánsa, a *BCRP* Q141K (Honjo 2002). Ahogy a 19. ábrán látható, mindhárom vizsgált rendszerben a *FV Leiden* rendszerhez hasonló tendenciájú

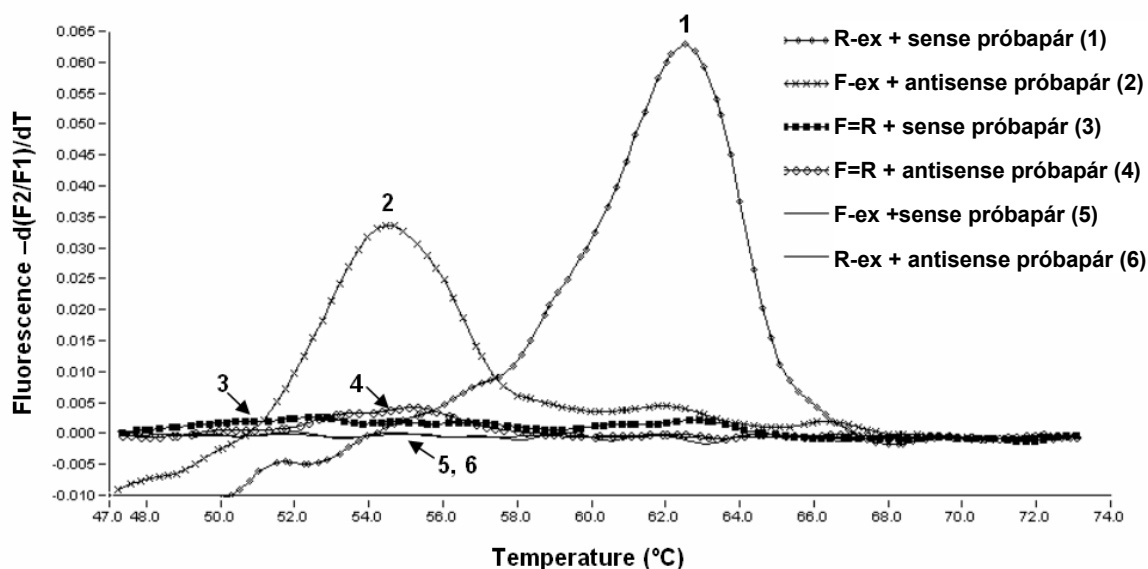
változásokat észleltünk, azaz a PA-értékek mindhárom esetben folyamatosan nőttek a reverse primer relatív koncentrációjának emelésével párhuzamosan. A négy mutáció-kimutatási rendszerben észlelt PA-érték növekedés átlagértéke 1:6,7 primer arány mellett 11,3-szoros.



19. ábra A különböző primer-arányok hatására bekövetkező PA-érték emelkedések összehasonlítása a FV Leiden, illetve három további genetikai variáns kimutatására szolgáló rendszerben. A FV Leiden (Leiden), a FII g.20210G>A (FII); a HFE H63D (H63D) és a BCRP Q141K (Q141K) genetikai variánsok kimutatása homozigóta DNS templátokkal és változatlan körülmények mellett történt az amplifikációs primer arányok kivételével, amelyeket az ábrával azonos módon jelöltünk. Az 1:1 primer arány mellett, a készülék által számított PA-értékek a következők: FV Leiden: 0.02; FII: 0.015; H63D: 0.0042; Q141K: 0.014. Az ábrán az „y” tengelyen az említett kiindulási értékekhez viszonyított változásokat ábrázoltuk.

Az aszimmetrikus PCR-reakcióban mindig annak a primernek kell a mennyiségét növelni, amely részvételével az alkalmazott hibridizációs oligonukleotidokkal komplementer DNS-szál szintézise valósul meg. Így a keletkező PCR-termékben is eltolt arányban lesz jelen a kétféle szintetikus DNS-szál, és ennek következtében a nagyobb mennyiségű szintetikus DNS-szálat felismerő hibridizációs oligonukleotid nagyobb mennyiségben képes kitapadni, és ezáltal nő a kibocsátott fluoreszcens fény intenzitása is. A fenti hipotézis bizonyítására újszerű megközelítést alkalmaztunk, és az FV Leiden kimutatási rendszerben az eredetivel egyező szakaszt, de az ellentétes szálon felismerő hibridizációs oligonukleotidokat is készítettünk. A szintetikus oligonukleotidok elrendezését lásd a „II.2. Módszerek” fejezet, II.2.2. Primer tervezés” című alfejezetében

(1. ábra). Az új hibridizációs oligonukleotidok nevében „comp” kiegészítéssel utaltunk a komplementer jellegre, mivel ezek pontosan komplementer szekvenciájúak a fent bemutatott valamennyi kísérletben használt „sense” hibridizációs oligonukleotidokkal, és az „antisense” szállal képesek hibridizálni. Ahogy a 20. ábrán látható, az új jelölt oligonukleotidokkal végzett kísérleteink megfeleltek a várakozásainknak, amennyiben pontosan fordított arányú aszimmetria, azaz az új oligonukleotidokkal komplementer szál szintézisét lehetővé tevő primer mennyiségének növelése mellett (2. görbe) kaptunk az eredeti aszimmetrikus rendszerhez (1. görbe) hasonlítható eredményeket.



20. ábra A FV Leiden meghatározás összehasonlítása két alternatív hibridizációs oligonukleotid-párral és különböző arányú amplifikációs primerekkel. A PCR reakciót a jelzett hibridizációs oligonukleotid-párok és szimmetrikus (1:1) arányú (3. és 4. görbék), illetve aszimmetrikus arányú (1. 2. 5. és 6. görbék) amplifikációs primerek jelenlétében végeztük, az 1. és 6. görbénél a reverse (R-ex), a 2. és 5. görbénél pedig a forward (F-ex) primert adva 3,3-szeres feleslegben. Az ábrán a LightCycler készülékben az olvadáspont elemzés során mért fluoreszcencia értékek negatív deriváltjai láthatók az aktuális mintahőmérséklet függvényében.

Az 1:1 amplifikációs primer aránytól eltérő arány (aszimmetrikus PCR) alkalmazását elsőként Lay és mtsai (1997) említik. Rendszerükben az egyik amplifikációs primer közvetlenül tartalmazta a fluoreszcens jelölést, és egyetlen hibridizációs oligonukleotid alkalmazása mellett a szignál-intenzitás növekedését észlelték. Ezt az eljárást a későbbiekben több más munkában követték (Lyon 1998; Wittwer 1997). Az általunk is használt, kettős hibridizációs oligonukleotidot alkalmazó rendszerekben elsőként Bernard

és mtsai (1999) említik az aszimmetrikus PCR alkalmazását. Ebben a munkában szintetikus, kompetitor hatású oligonukleotidokkal bizonyították az aszimmetrikus PCR mechanizmusát. Burggraf és mtsai (2002) szintén alkalmazták az aszimmetrikus PCR-t, amelynek használatával sikerült a megfelelő genotípus-eredményt leolvasniuk, eltolt primer arányok esetén azonban nem észlelték a szignál-intenzitás növekedését. Ez ellentétes a szignál-intenzitás általunk megfigyelt jelentős növekedésével. Barrat és mtsai-nak (2002) egy másik ismert, nem kívánatos jelenségtől, a hook-effektustól sikerült megszabadulni az aszimmetrikus PCR segítségével, és esetükben a szignál-intenzitás is jelentősen növekedett. További közlemények is említik az aszimmetrikus PCR alkalmazását további részletek közlése nélkül (Walker 2001; Logan 2001; Randen 2003).

Összefoglalva: A LightCycler hibridizáción alapuló genotipizálási rendszerben tehát 4 különböző genetikai variáns elemzése során kimutattuk, hogy a megfelelő irányban eltolt arányú amplifikációs primerek alkalmazása valamennyi rendszerben jelentősen növeli a hatékonyságot és a specificitást. Újszerű megközelítést alkalmaztunk az aszimmetrikus PCR hatásmechanizmusának bizonyítására. Az aszimmetrikus PCR körülményeket célszerű kipróbálni a saját tervezésű reagensek optimális alkalmazási körülményeinek beállítása során.

IV. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK

Összefoglalásként elmondható, hogy az értekezésben bemutatott projektek révén az eltelt 10 évben egy új szakterület, a molekuláris genetika két fontos területén sikerült megvalósítani az alapvető laboratóriumi, statisztikai, számítógépes és logisztikai módszerek beállítását és számos jelentős módszertani fejlesztést. Ebben az időszakban egy igazi csapat irányítójaként laboratóriumunk alább felsorolt konkrét eredményeinek elérésében vettem részt.

(1) Komplex molekuláris vizsgálati algoritmust dolgoztunk ki A típusú, örökletes hemofiliában, amely direkt mutáció-kimutatás és indirekt marker-vizsgálatok segítségével teszi lehetővé a molekuláris szintű hordozó-, illetve prenatális diagnosztikát.

(2) Az értekezés beadásának időpontjáig országos programunk keretében 158 családot vizsgáltunk, 95 esetben végeztünk hordozó- és 16 esetben prenatális vizsgálatot.

(3) 138, súlyos, HA-családnál vizsgáltuk két gyakori nagyméretű DNS-szakaszokat érintő mutáció (22., illetve 1. intron inverzió) előfordulását. 75 esetben mutattuk ki a 22. intron inverzióját, a fennmaradó 63 családból egy 1. intron inverzió-pozitív esetet találtunk.

(4) Elvégeztük négy ritka *FVIII* gén mutáns részletes molekuláris jellemzését.

(5) Szintén végeztünk indirekt családvizsgálatokat B típusú, hemofiliában, később áttértünk a *FIX* gén közvetlen szekvenálására, és 21 HB-családnál 19 kóroki mutációt találtunk.

(6) A C1-INH fehérje deficienciájával járó, örökletes angioneurotikus oedemában szenvedő 23 vizsgált család közül 4 esetben írtunk le nagyméretű deléciót, 19 esetben pedig egyéb, kóroki mutációt a *C1-INH* génben. Utóbbiak közül 13 korábban még nem ismert mutációt azonosítottunk.

(7) Egy nemzetközi együttműködés keretében létrehoztunk egy internetes lokusz-specifikus mutációs adatbázist, amely a dolgozat írásakor 148 különböző *C1-INH* mutációt tartalmazott.

(8) Egy igen súlyos, fiatalkori hemokromatózisban szenvedő betegnél egy korábban még nem ismert, csonkolt fehérje keletkezését eredményező mutációt fedeztünk fel a *hemojuvelin* génben.

(9) Elsőként állapítottuk meg a klasszikus örökletes *HFE*-hemokromatózis legfontosabb, kaukázusi populációkra jellemző genetikai kockázati tényezőjének magyarországi gyakoriságát.

(10) Egy jelentős esetszámú, véradóknál végzett genetikai szűrővizsgálat során nem találtunk jelentős különbséget az első, illetve sokszoros véradók között a *HFE* gén C282Y mutáció előfordulási gyakoriságát illetően, ami arra utalt, hogy ez a genetikai kockázati tényező nem játszik jelentős szerepet a sokszoros véradóknál fellépő esetleges vashiány elleni védelemben.

(11) Elsőként határoztuk meg a mélyvénás trombózis egyik leggyakoribb genetikai kockázati tényezőjének, az V. alvadási faktor gén Leiden mutációjának magyarországi gyakoriságát, amely alapján indokoltá vált a mutáció-kimutatás rutinszerű elvégzése érintetteknel és vérrokonaiknál.

(12) A valós idejű PCR technikával végzett genotipizálás beállítása során részletes vizsgálatokat végeztünk a legkedvezőbb amplifikációs primer-arányok megismerése céljából. Több genetikai variáns vizsgálata során kimutattuk, hogy aszimmetrikus arányban

alkalmazott amplifikációs primerek esetén a szignál-intenzitás jelentős emelkedése érhető el. Új megközelítéssel bizonyítottuk azt a megfigyelést, hogy az aszimmetrikus PCR-reakcióban mindig annak a primernek kell a mennyiségét növelni, amely az alkalmazott hibridizációs oligonukleotidokkal komplementer DNS-szál szintézisét teszi lehetővé.

A betegségokozó mutációk azonosítása iránti igény a jövőben bizonyosan fokozódik mind a jelen dolgozatban tárgyalt, mind új kórképek esetében, így valószínűsíthető, hogy a bemutatott munkák következtetései és tapasztalatai a tárgyalt kórképek mellett újabb konkrét betegségek, illetve gének vizsgálatánál is hasznosulni fognak.

A monogén betegségek elemzésével párhuzamosan sikerült megteremteni a populációgenetikai vizsgálatok és adatelemzés módszertani alapjait. Jelentős eredmény a néhány fontos genetikai eltérésre vonatkozó első regionális adatszolgáltatás, amely nemzetközi illetve hazai referenciaként használható. Szintén fontosnak tartom a nagy esetszámú véradó-szűrés megvalósítását, amely populációs DNS-gyűjtemény (DNS-bank) hasznos és értékes segítség volt nemcsak saját, későbbi polimorfizmus-vizsgálatainkban, de több hazai együttműködésben is. Az első sikeres „DNS-bankolási” projektünket később több más gyűjtőmunka megindítása követte, így napjainkra több jelentős DNS- és információs gyűjtemény áll rendelkezésünkre. A populációs adatok és a kialakított populációgenetikai módszerek jó kiindulási pontként szolgálhatnak további, a jelenlegi időszakban igen népszerű asszociációs vizsgálatokhoz.

Szintén óriási értéknek tartom azt a bennem és kollégáimban kialakult szemléletet, gondolkodásmódot, amit az elmúlt mintegy 10 év közös küzdelmei során gyakorlatilag saját magunk alakítottunk ki és szereztünk meg, hiszen ilyen típusú, klinikai molekuláris genetikai tevékenységet előttünk egyik kutatócsoport sem művelt intézetünkben. Ebbe a gondolkodásmódba beletartoznak egyfelől a molekuláris genetikai alapfogalmak, megközelítések, kérdésfeltevési módok, a szakirányú irodalom (sokszor közel sem megfelelő alaposágú) ismerete. Az elsajátított gondolkodásmód másik része a laboratóriumi technikák ismerete, azok végrehajtása, és különösen a finom buktatók, újítások, trükkök megismerése. A molekuláris genetika az orvosbiológiai kutatások egyik olyan különleges területe, ahol a laboratóriumi módszerek szélsőségesen nagy számával, a megoldási lehetőségek, és különleges készülékek jó néhány variációjával kell szembenéznie a területen dolgozó szakembernek. Ebben a folyamatosan változó, megújuló rendszerben próbáltuk kialakítani a kérdésfeltevéseinkhez és anyagi lehetőségeinkhez illeszkedő módszeregyüttest. Nagy értéknek tartom tehát az írásos formában rendelkezésünkre álló laboratóriumi módszertani protokoll-gyűjteményünket, amelyet szervesen egészít ki a szájhagyomány útján terjedő, nehezen írásba foglalható személyes tapasztalat. Remélhetőleg a jövőben valamennyi említett információforrás továbbra is rendelkezésünkre fog állni és lesz alkalmunk azokat hasznosítani, illetve továbbadni.

**V. A TÉMAKÖRBEN A KANDIDÁTUSI ÉRTEKEZÉS BEADÁSA ÓTA
SZÜLETETT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK**

**V.1. A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK (EMLÍTÉSÜK
SORRENDJÉBEN)**

1. Klein, I., Andrikovics, H., Bors, A., Nemes, L., **Tordai, A.**, Váradi A. 2001. A haemophilia A and B molecular genetic diagnostic program in Hungary: a highly informative, cost-effective strategy. *Haemophilia* **7**:306-312. (IF : **0,756**)
2. Andrikovics, H., Klein, I., Bors, A., Nemes, L., Váradi A., **Tordai, A.** 2003. Analysis of large structural changes of the factor VIII gene in severe hemophilia A. *Haematologica* **88**:778-84. (IF : **3,453**)
3. Kalmár L., Bors, A., Farkas, H., Vas, S., Fandl, B., Varga, L., Füst, G., **Tordai, A.** 2003. Mutation screening of the C1 inhibitor gene among Hungarian patients with hereditary angioedema. *Human Mutation* **22**:498. (IF : **6,328**)
4. Kalmár L., Hegedűs, T. Farkas, H., Nagy, M., and **Tordai, A.** 2005. Creation of a novel interactive, locus-specific mutation database of the C1 inhibitor gene. *Human Mutation* **25**:1-5. (IF: **6,328**)
5. Jánosi A, Andrikovics H, Vas K, Bors A, Hubay M, Sápi Z, and **Tordai A.** 2005. Homozygosity for a novel nonsense mutation (G66X) of the HJV gene causes severe juvenile hemochromatosis with fatal cardiomyopathy. *Blood* **105**:432. (IF: **10,120**)
6. **Tordai, A.**, Klein I., Andrikovics H., Kalmár L., Sarkadi, B., Rajczy, K., Péntzes, M., Váradi A. 1998. High frequency of the haemochromatosis C282Y point mutation can argue against its Celtic origin. *J. Med. Genet.* **35**:878-879. (IF : **2,682**)
7. Andrikovics, H., Klein, I., Kalmár, L., Bors, A., Jermendy, Gy., Petri, I., Kalász, L., Váradi, A., és **Tordai, A.** 1999. Új, molekuláris genetikai módszer az öröklődő hemokromatózis differenciáldiagnosztikájában. *Orvosi Hetilap* **140(45)**:2517-2522.
8. Andrikovics, H., Kalmár, L., Bors, A., Fandl, B., Petri, I., Kalász, L., **Tordai, A.** 2001. Genotype screening for hereditary hemochromatosis among voluntary blood donors in Hungary. *Blood Cells Mol. Dis.* **27**:334-341. (IF : **1,703**)
9. Várkonyi, J., Tarkovács, G., Karádi, I., Andrikovics, H., Varga, F., Varga, F., Demeter, J., and **Tordai, A.** 2003. High incidence of hemochromatosis gene mutations in the myelodysplastic syndrome: The Budapest study on 50 patients. *Acta Hematol.* **109**:64-7. (IF : **1,874**)
10. **Tordai, A.**, Klein I., Rajczy, K., Péntzes, M., Sarkadi, B., Váradi, A. 1997. Prevalence of factor V Leiden (Arg506Gln) in Hungary. *Br. J. Hematol.* **99**:466-467. (IF : **3,370**)

11. Szilvási A, Andrikovics H, Kalmár L, Bors A, and Tordai A. Asymmetric PCR increases efficiency of melting peak analysis on the LightCycler. *Clin. Biochemistry közlés alatt*. (IF : **1,825**)

V.2. EGYÉB SAJÁT NEMZETKÖZI KÖZLEMÉNYEK (IDŐRENDI SORRENDEN)

11. Várkonyi, J., Kaltwasser, J.P., Seidl, C., Kollai, G., Andrikovics, H., **Tordai, A.** 2000. A case of non-HFE juvenile haemochromatosis presenting with adrenocortical insufficiency. *Br. J. Hematol.* **109**:252-253. (IF : **3,068**)
12. Farkas H, Visy B, Fekete B, Karádi I, Kovács JB, Kovács IB, Kalmár L, **Tordai A**, Varga L. 2002. Association of celiac disease and hereditary angioneurotic edema. *Am J Gastroenterol* **97**:2682-3. (IF: **3,953**)
13. Krikovsky D, Vásárhelyi B, Treszl A, Korner A, **Tordai A**, Tulassay T, Madácsy L. 2002. Genetic polymorphism of interleukin-1beta is associated with risk of type 1 diabetes mellitus in children. *Eur J Pediatr* **161**:507-8. (IF: **1,223**)
14. Györfly B, Vásárhelyi B, Krikovszky D, Madácsy L, **Tordai A**, Tulassay T, Szabó A. 2002. Gender-specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* **147**:803-8. (IF : **2,560**)
15. Hunter, M, Heyer, E, Austerlitz, F, Angelicheva, D, Nedkova, V, Briones, P, Aata, G, De Pablo, R, László, A, Bosshard, N, Gitzelmann, R, **Tordai, A**, Kalmár, L, Szalai, C, Balogh, I, Lupu, C, Corches, G, Popa, Perez-Lezaun, A, Kalaydjieva, L.V. 2002. The P28T mutation in the *galk1* gene accounts for galactokinase deficiency in Roma (gypsy) patients across Europe. *Pediatr. Res.* **51**:602-606. (IF : **3,382**)
16. Deák B, Dobos I, Kocsis D, Krikovszky D, **Tordai A**, Madácsy L, Tulassay T, Vásárhelyi B. 2003. HbA1c levels and erythrocyte transport functions in complication-free type 1 diabetic children and adolescents. *Acta Diabetol.* **40**:9-13. (IF : **0,811**)
17. Fekete A, Treszl A, Tóth-Heyn P, Vannay Á, **Tordai A**, Tulassay T, Vásárhelyi B. 2003. Association between heat shock protein 72 gene polymorphism and acute renal failure in premature neonates. *Pediatr Res* **54**:452-5. (IF : **3,064**)
18. Morar B, Gresham D, Angelicheva D, Tournev I, Gooding R, Guerguelcheva V, Schmidt C, Abicht A, Lochmuller H, **Tordai A**, Kalmár L, Nagy M, Karcagi V, Jeanpierre M, Herczegfalvi A, Beeson D, Venkataraman V, Warwick Carter K, Reeve J, De Pablo R, Kucinkas V, Kalaydjieva L. 2004. Mutation history of the Roma/Gypsies. *Am J Human Genet* **75**:596-609. (IF : **11,602**)

19. Szamosi T, Roth E, Szamosi T Jr, Tomsits E, **Tordai A**, Szabo T. 2004. Hyperhomocysteinemia, enzyme polymorphism and thiobarbituric acid reactive system in children with high coronary risk family history. *J Am Coll Nutr.* **23**:386-90. (IF : **2,979**)
20. Bors A, Andrikovics A, Kalmár A, Erdei N, Galambos S, Losonczi A, Füredi S, Balogh I, Szalai C, **Tordai A**. 2004. Frequencies of two common mutations (35delG and 167delT) of the connexin 26 gene in different populations of Hungary. *Int J Mol Med* **14**:1105-8. (IF : **1,940**)
21. Kádár K, Demeter J, Andrikovics H, **Tordai A**, Kovács M, Füst G, Karádi I, Várkonyi J. 2005. TNF- α promoter gene polymorphism in patients with myelodysplastic syndrome. *Acta Hematol. közlés alatt.* (IF : **1,874**)
22. Arányi T, Ratajewski M, Bardóczy V, Pulaski L, Bors A, **Tordai A**, Váradi A. 2005. Identification of a DNA methylation-dependent activator sequence in the pseudoxanthoma elasticum gene, *ABCC6*. *J. Biol. Chem. közlés alatt.* (IF : **6,482**)

V.3. EGYÉB SAJÁT HAZAI KÖZLEMÉNYEK (IDŐRENDI SORREND BEN)

23. Fritz, F., Walter, Gy., **Tordai, A.**, és Fekete Gy. 1997. Haemochromatosis: az impotencia egyik oka. *Magyar Andrológia* **97/3**:110-111.
24. Klein, I., **Tordai, A.**, Nemes, L., Sas G., Váradi A. 1998. Indirekt módszerek a hemofilia A genetikai diagnosztikájában. *Orvosi Hetilap* **139**:487-491.
25. Bernát, S., Metz, E., Gonda, F., és **Tordai, A.** 1998. PLA^2 : A myocardialis infarctus új genetikai rizikófaktor. *Orvosi Hetilap* **139(39)**:2319-2321.
26. Várkonyi, J., Kaltwasser, J.P., Seidl, C., **Tordai, A.**, Andrikovics, H., Kollai, G., Müzes, Gy., Tulassay, Z., Romics, L. 2000. A mellékvesekéreg csökkent működésében manifesztálódó juvenilis haemochromatosis. *Lege Artis Medicinae* **10**:126-129.
27. Andrikovics, H., Kalmár, L., Bors, A., Petri, I., Kalász, L., és **Tordai, A.** 2000. Az öröklődő haemochromatosis genetikai háttere. *Transzfúzió* **33(1)**:3-8.
28. Andrikovics H., Kalmár L., Bors A., Petri I., Kalász L., **Tordai A.** 2000: Az öröklődő haemochromatosis molekuláris genetikai szűrése vradók között. *Transzfúzió* **33 (2)**: 55-61.
29. Pongrácz, E., **Tordai, A.**, Csornai, M., és Nagy, Z. 2001. Stroke-betegek thrombocytá glikoprotein IIb/IIIa (Leu Pro33) polimorfizmusának vizsgálata. *Orvosi Hetilap* **142(15)**:781-785.

30. Pongrácz, E., **Tordai, A.**, Andrikovics, H., Szén, L., és Nagy, Z. 2001. A protrombin gén G20210A polimorfizmusának vizsgálata fiatalkori ishemiás stroke-os betegeknél. *Agyérbetegségek* **2**:9-13.
31. Pongrácz E, **Tordai A**, Csornai M, Nagy Z. 2002. A véralvadási rendszer genetikai eltérései fiatalkori stroke-os betegeknél *Ideggyógyászati Szemle* **55**:111-7.
32. Pongrácz E, **Tordai A**, Csornai M, Nagy Z. 2002. Az ACE gén inszerció/delécio polimorfizmusának vizsgálata stroke-os betegeknél. *Ideggyógyászati Szemle* **55**:156-63.
33. Pongrácz E, **Tordai A**, Csornai M, Béla Zs, Nagy Z. 2003. Van-e jelentősége az V. faktor gén R506Q (Leiden) mutációjának ischaemiás stroke esetén? *Ideggyógyászati Szemle* **56**:157-64.

VI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönetet mondok közvetlen munkatársaimnak, *dr. Andrikovics Hajnalkának, Kalmár Lajosnak, Bors Andrásnak, Szilvási Anikónak, Horváth Csongorné Magdinak, Pfundt Antalné Júliának, Bakonyi Ildikónak és Szaver Gabriellának*, akik egy stabil csapatot alkotva az eltelt évtizedben igazi, - és nemcsak - munka-társaim voltak. Az ő közreműködésük nélkül a dolgozatban bemutatott eredmények nem születhettek volna meg. Köszönöm mentoromnak, *dr. Sarkadi Baláznak* a folyamatos támogatást és bátorítást, az ötleteket, az önállóságra való biztatást, és a különböző jellegű konkrét segítséget, amit a laboratórium elindításakor mint közvetlen főnököm, majd később mint kutatási vezető számomra és a laboratórium számára nyújtott. Köszönöm korábbi tanítóimnak, *Prof. Machovich Raymundnak, Prof. Gárdos Györgynek és Prof. Erwin Gelfandnak*, hogy a megfelelő időben, a megfelelő irányban és a megfelelő mértékben igazítottak pályám koordinátáin, és emellett mindenben segítették kutatói tevékenységemet. Köszönöm az Intézet jelenlegi és korábbi főigazgatóinak *dr. Vályi-Nagy Istvánnak és Prof. Petrányi Győzőnek* hogy biztosították munkámhoz a támogató körülményeket. Megköszönöm *dr. Váradi András és dr. Klein Izabel* segítségét a DNS-munka kezdeti elsajátításában és a kezdetek óta is megőrzött intenzív és kellemes együttműködés fenntartásáért. Köszönettel tartozom kiváló klinikus partnereinknek, *dr. Nemes Lászlónak, dr. Farkas Henriettnek, dr. Várkonyi Juditnak, dr. Jánosi Andrásnak, és dr. Hajdú Krisztinának*, akik nélkülözhetetlen segítséget adtak és adnak a betegek felkutatásában, kivizsgálásában, valamint a minták és adatok összegyűjtésében. Köszönöm valamennyi intézeti és intézeten kívüli társszerzőmnek a tudományos együttműködést.

E helyen is köszönetet mondok az Alapítvány a Magyar Felsőoktatásért és Kutatásért által adományozott Magyar Zoltán posztdoktori ösztöndíjért és az MTA által biztosított Bolyai János kutatási ösztöndíjért. Köszönöm a következő támogató szervezeteknek a kutatómunkáinkhoz nyújtott kiemelkedő fontosságú anyagi támogatásokat: Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA), Egészségügyi Minisztérium (ETT-támogatások), Oktatási Minisztérium (OMFB, Biotechnológiai, NKFP Széchenyi támogatások).

Végül köszönetet mondok családomnak, *feleségemnek*, *Ágotának*, és *édesanyámnak*, *anyukámnak*, hogy mindvégig lankadatlanul biztosították a sziklaszilárd, harmonikus és megértő családi hátteret.

VI. IRODALOMJEGYZÉK

- Acquila, M et al. Frequency of factor VIII intron 1 inversion in a cohort of severe hemofilia A Italian patients. *Haematologica* 2003; 88: (05) ELT17.
- Adams, PC et al. Clinical presentation of haemochromatosis: a changing scene. *Am J Med* 1991; 90: 445-49.
- Adams, PC et al. EASL International Consensus Conference on haemochromatosis. *J Hepatol* 2000; 33: 485-504.
- Adams, PC et al. Prevalence of abnormal iron studies in heterozygotes for hereditary haemochromatosis: an analysis of 255 heterozygotes. *Am J Haematol* 1994; 45: 146-9.
- Agostoni A, Cicardi M. Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore)* 1992;71:206-15.
- Ajioka, RS et al. Clinical consequences of iron overload in hemochromatosis homozygotes. *Blood* 2003; 101: 3351-4.
- Akbary AM. et al. Efficacy and tolerability of Icatibant (Hoe 140) in patients with moderately severe chronic bronchial asthma. *Immunopharmacology* 1996;33:238-42.
- Alessandrino EP et al. Italian Society of Hematology. Evidence- and consensus-based practice guidelines for the therapy of primary myelodysplastic syndromes. A statement from the Italian Society of Hematology. *Haematologica*. 2002;87:1286-306.
- Antonarakis SE and the Nomenclature Working Group. 1998. Recommendations for a Nomenclature System for Human Gene Mutations. *Hum Mutat* 11: 1-3.
- Antonarakis, SE et al. Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A: Results of an international consortium study. *Blood* 1995; 86: 2206-12.
- Ariga T et al. 1990. Recombinations between the *Alu* repeat sequences that result in partial deletions within the C1 inhibitor gene. *Genomics* 8: 607-613.
- Bagnall, RD et al. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemofilia A. *Blood* 2002; 99: 168-74.
- Balogh I et al. High frequency of factor V Leiden mutation and prothrombin 20210A variant in Romanies of Eastern Hungary. *Thromb Haemost.* 1999 Nov;82(5):1555-6.

- Barratt K, Mackay JF. Improving real-time PCR genotyping assays by asymmetric amplification. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1571-2.
- Barton JC et al. HFE C282Y and H63D in adults with malignancies in a community medical oncology practice. *BMC Cancer.* 2004;4:1-8.
- Beaumont C et al. Mutation in the iron responsive element of the L ferritin mRNA in a family with dominant hyperferritinaemia and cataract. *Nat Genet* 1995;11:444-6.
- Bell, H et al. Prevalence of haemochromatosis among first-time and repeat blood donors in Norway. *J Hepatol* 1997; 26: 272-9.
- Bernard PS et al. Color multiplexing hybridization probes using the apolipoprotein E locus as a model system for genotyping. *Anal Biochem.* 1999;273:221-8.
- Bertina RM et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369:64-67.
- Beutler E et al. Iron deficiency and overload. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2003;40-61.
- Beutler, E et al. Mutational analysis in hereditary haemochromatosis. *Blood Cell Mol Dis* 1996; 22: 187-94.
- Beutler, E et al.: Penetrance of 845G→A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002; 359: 211-18.
- Beutler, E. The HFE Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis. *Blood* 2003; 101: 3347-50.
- Blanch A et al. 2002. Detection of C1 Inhibitor (SERPING1/C1NH) Mutations in Exon 8 In Patients With Hereditary Angioedema: Evidence For 10 Novel Mutations. *Hum Mutat* 20:405-6.
- Bock SC et al. 1986. Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry* 25: 4292-4301.
- Bolton-Maggs, PH et al: Haemophilias A and B. *Lancet* 2003; 361: 1801-9.
- Bomford, A. Genetics of haemochromatosis. *Lancet* 2002; 360: 1673-81.
- Borot, N et al. Mutations in the MHC class I-like candidate gene for haemochromatosis in French patients. *Immunogenetics* 1997; 45: 320-4.
- Bos I. et al.. 2002. Structural and functional aspects of C1-inhibitor. *Immunobiology* 205:518-533.
- Bosio S et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 2000;25:14-5.
- Bulaj, ZJ. et al. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for haemochromatosis. *New Eng J Med* 1996; 335: 1799-805.
- Burggraf S et al. Unexplained DNA melting behavior in a genotyping assay. *Clin Chem.* 2002;48:199-201.
- Camaschella, C. et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 2000; 25: 14-5.
- Carella, M. et al. Mutational analysis of the HLA-H gene in Italian haemochromatosis patients. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 828-32.

- Carter PE. et al. Complete nucleotide sequence of the gene for human C1 inhibitor with an unusually high density of Alu elements. *Eur J Biochem.* 1991;197:301-8.
- Christensen T et al. The effect of iron chelation on haemopoiesis in MDS patients with transfusional iron overload.
- Cicardi M, Agostoni A. Hereditary angioedema *N Engl J Med* 1996; 25: 1666-67
- Claustres M et al. 2002. Time for a unified system of mutation description and reporting: a review of locus specific mutation databases. *Genome Res* 12:680–688.
- Cugno M et al. Activation of factor XII and cleavage of high molecular weight kininogen during acute attacks in hereditary and acquired C1 inhibitor deficiencies *Immunopharmacology* 1996; 33: 361-64
- Dahlbäck B. et al. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:1004-1008.
- Davis AE 3rd. C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema. *Annu Rev Immunol* 1988;6:595-628.
- Davis AE III et al. 1986. Human inhibitor of the first component of complement, C1: characterization of cDNA clones and localization of the gene to chromosome 11. *Proc Nat Acad Sci* 83: 3161-3165.
- De Gobbi M. et al. Natural history of juvenile haemochromatosis. *Br J Haematol.* 2002; 117:973-9.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. 2000. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15:7-12.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. 2001. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 109:121-4.
- Donaldson VH, Evans RR. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema: Absence of serum inhibitor of C1 esterase. *Am J Med* 1963, 35: 37-44.
- Eldering E. et al. 1995. COOH-terminal substitutions in the serpin C1 inhibitor that cause loop overinsertion and subsequent multimerization. *J Biol Chem* 270: 2579-2587.
- Feder, JN. et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13: 399-408.
- Feder, JN. et al. The haemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts β 2-microglobulin interaction and cell surface presentation. *J Biol Chem* 1997; 272: 14025-8.
- Filali M. et al. Juvenile hemochromatosis HJV-related revealed by cardiogenic shock. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 33 (2004) 120-124.
- Franchini M, Veneri D. Iron-chelation therapy: an update. *Hematol J.* 2004;5:287-92.
- Franco RF, Reitsma PH. Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet* 2001; 109:369-84.
- Freiberger T. et al. 2002. Five Novel Mutations in the C1 Inhibitor Gene (C1NH) Leading to a Premature Stop Codon in Patients With Type I Hereditary Angioedema. *Hum Mutat* 19:461.

- Gattermann, N. From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2000; 24: 141-51.
- Giannelli F. et al. Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions--eighth edition. *Nucleic Acids Res.* 1998 Jan 1;26(1):265-8.
- Gitschier J. et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312: 326.
- Goodeve AC. et al. Factor VIII rearrangements in patients with severe haemophilia A. *Lancet* 1994; 343: 329-30.
- Greengard JS. et al. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet.* 1994;343:1362-1363.
- Halliwell B. et al. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85.
- Harris ZL. et al. Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2539-43.
- Honjo Y. et al. Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis in the ABC half-transporter ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1). *Cancer Biol Ther.* 2002;1:696-702.
- Horaitis O, Cotton RGH. 2004. The challenge of documenting mutation across the genome: the human genome variation society approach. *Hum Mutat* 23:447-52.
- Huber R, Carrell RW. 1989. Implications of the three-dimensional structure of α_1 -antitrypsin for striker and functions of serpins. *Biochemistry* 28: 8951-8966.
- Jazwinska, EC. et al. Haemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet* 1996; 14: 249-51.
- Jensen PD. et al. The effect of iron chelation on haemopoiesis in MDS patients with transfusional iron overload. *Br J Haematol.* 1996;94:288-99.
- Jouanolle, AM. et al. Haemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet* 1996; 14: 251-2.
- Kato J. et al. A mutation, in the iron responsive element of H ferritin mRNA, causing autosomal dominant iron overload. *Am J Hum Genet* 2001;69:191-7.
- Kazazian, HH. et al. Hemofilia A and parahemofilia: deficiencies of coagulation factors VIII and V. pp. 3241-67 in: Scriver, CR et al. (eds): *The metabolic and molecular bases of inherited disease* vol III, McGraw-Hill, 1995, 7th edition.
- Kontula K. et al. Arg506Gln factor V mutation (factor V Leiden) in patients with ischaemic cerebrovascular disease and survivors of myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 1995 Apr;73(4):558-60.
- Koster T. et al. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden thrombophilia study. *Lancet.* 1993;342:1503-1506.
- Lakich, D. et al. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993; 5: 236-41.
- Lalloz, MR. et al. Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinukleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* 1991; 338: 207-11.
- Lanzara C. et al. Spectrum of hemojuvelin gene mutations in 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Blood.* 2004; 103:4317-21.
- Lay ML, Wittwer CT. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem.* 1997;43:2262-7.

- Lee PL. et al. Genetic abnormalities and juvenile hemochromatosis: mutations of the HJV gene encoding hemojuvelin. *Blood*. 2004; 103:4669-71.
- Liu, Q. et al. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in haemophilia A. *Blood* 1998; 92: 1458-9.
- Ljung, RCR. Origin of mutation in sporadic cases of haemophilia A. *Br J Haemat* 1999; 106: 870-4.
- Loeb, LA. et al. Mutagenesis by autoxidation of iron with isolated DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3918-22.
- Logan JM. et al. Rapid identification of *Campylobacter* spp. by melting peak analysis of biprobes in real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2227-32.
- Lyon E. et al. Detection and Identification of Base Alterations Within the Region of Factor V Leiden by Fluorescent Melting Curves. *Mol Diagn*. 1998;3:203-209.
- Machovich, R.: Hemosztázis. pp. 589-609. in Ádám, V et al.: Orvosi biokémia. Medicina Könyvkiadó Rt., 2001, 2. kiadás.
- Mann KG. Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood*, 2003; 101:20-30.
- Martin ME. et al. A point mutation in the bulge of the iron-responsive element of the L ferritin gene in two families with the hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Blood* 1998;91:319–23.
- Martinelli I. Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001;86:395-403.
- Merryweather-Clarke, AT et al. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet* 1997; 34: 275-8.
- Miller, CH. Genetics of hemofilia and von Willebrand's disease in: Hemofilia in the child and adult. Hilgartner, MW, Pochedly, C eds. Raven Press, 1989, 3rd edition, p. 306.
- Miller, SA. et al. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988; 16: 1215-8.
- Montosi G. et al. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest* 2001;108:619–23.
- Nagy B. et al. Detection of factor V Leiden mutation in severe pre-eclamptic Hungarian women. *Clin Genet*. 1998;53(6):478-81.
- Naylor, JA. et al. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe hamophilia A. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1773-8.
- Naylor, JA. et al. Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1217-24.
- Nelson A gyermekgyógyászat tankönyve. Szerk.: Behrman, RE., Kliegman, RM, Melania Kiadó, 1995, 1. magyar kiadás.
- Nelson, RL. et al. Risk of neoplastic and other diseases among people with heterozygosity for hereditary hemochromatosis. *Cancer* 1995; 76: 875-9.
- Nemeth E. et al. Hpcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute phase protein. *Blood* 2003;101:2461–3.

- Nicolas G. et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia. *J Clin Invest* 2002;110:1037–44.
- Niederau, C. et al. Long-term survival in patients with hereditary haemochromatosis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1107-19.
- Niederau, C. et al. Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary haemochromatosis. *New Eng J Med* 1985; 313: 1256-62.
- Nielsen EW. et al. Activation of the complement, coagulation, fibrinolytic systems during attacks of hereditary angioedema *Immunopharmacology* 1996; 33: 359-60
- Nielsen, P. et al. Prevalence of the C282Y and H63D mutations in the HFE gene in patients with hereditary hemochromatosis and in control subjects from Northern Germany. *Br J Haematol* 1998; 103, 842-5.
- Njajou OT. et al. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet* 2001;28:213–4.
- Olds RJ. et al. The multigenic basis for venous thrombosis. *Br J Haematol* 2000; 109:508-11.
- Papanikolaou G. et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.* 2004; 36:77-82.
- Pappalardo E. et al. 2000. Frequent de novo mutations and exon deletions in the C1 inhibitor gene of patients with angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 106: 1147-54.
- Peake, I. The molecular bases of haemophilia A. *Haemophilia* 1998; 4: 346-9.
- Peake, IR. et al. Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis. *Blood Coag Fibrinol* 1993; 4: 313-44.
- Randen I. et al. Rapid and reliable genotyping of human platelet antigen (HPA)-1, -2, -3, -4, and -5 a/b and Gov a/b by melting curve analysis. *Transfusion.* 2003;43:445-50.
- Rees DC. et al. Born to clot: the European burden. *Br J Haematol.* 1999;105(2):564-6.
- Rees DC. et al. World distribution of factor V Leiden. *Lancet.* 1995 Oct 28;346(8983):1133-4.
- Reese MG. et al. 1997. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 4: 311-23.
- Riccardi, F. et al. Intron 1 factor VIII gene inversion in a population of Italian hemophilia A patients. *Blood* 2002; 100: 3432.
- Ridker PM. et al. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1995; 6;332(14):912-7.
- Roberts, HR. et al. Hemophilia and related conditions-inherited deficiencies of prothrombin (factor II), factor V, and factors VII to XII. pp 1413-23 in: Beutler, E et al. (eds.): *Williams Hematology*, McGraw-Hill, Inc.,1995, 5th edition.
- Robson KJH. et al. Recent advances in understanding haemochromatosis. *J Med Genet* 2004;41:721-730.
- Roetto A. et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile haemochromatosis. *Nat Genet* 2003;33:21–2.
- Roetto A. et al. Screening hepcidin for mutations in juvenile hemochromatosis: identification of a new mutation (C70R). *Blood* 2004; 103:2407-9.

- Rossiter, JP. et al. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1035-39.
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-86.
- Sanchez J. et al. Low prevalence of the factor V Leiden among patients with ischemic stroke. *Haemostasis*. 1997;27(1):9-15.
- Schreiber AD. et al. Inhibition of C1-INH of Hageman factor fragment activation of coagulation, fibrinolysis and kinin generation *J Clin Invest* 1987; 316: 1525-1530
- Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* 2001; 344:1222-31.
- Shaheen, NJ. et al. Clinical characteristics of hereditary hemochromatosis patients who lack the C282Y mutation. *Hepatology* 1998; 28: 526-9.
- Sifontes MT. et al. The factor V Leiden mutation in children with cancer and thrombosis. *Br J Haematol*. 1997; 96(3):484-9.
- Simon, M. et al. Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis. *Gut* 1976; 17: 332-4.
- Skriver K. et al. CpG mutations in the reactive site of human C1 inhibitor. *J Biol Chem* 1989;264:3066-71.
- Späth P, Wüthrich B. Inherited and acquired deficiencies of C1 esterase inhibitor in humans. In: Rother K, Till G, Hänsch G, editors. *The complement system*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1998. p. 353-410.
- Speletas M. et al. Prevalence of hemochromatosis gene (*HFE*) mutations in Greek patients with myelodysplastic syndromes. *Acta Haematologica*, 2003; 110:53-54.
- Stankovics J. et al. Incidence of factor V G1681A (Leiden) mutation in samplings from the Hungarian population *Orv Hetil*. 1998;139(19):1161-3.
- Stenson PD. et al. Human gene mutation database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* 2003; 21: 577-81.
- Stoppa-Lyonnet D. et al. 1987. Altered C1 inhibitor genes in type I hereditary angioedema. *New Eng J Med* 317: 1-6.
- Stoppa-Lyonnet D. et al. 1990. Clusters of intragenic *Alu* repeats predispose the human C1 inhibitor locus to deleterious rearrangements. *Proc Natl Acad Sci* 87: 1551-1555.
- Strachan, T. et al. *Human molecular genetics*, Bios Scientific Publishers, Oxford, 1996; pp. 313-334.
- Szakony, Sz. et al. The frequency of the hemochromatosis C282Y mutation in the ethnic Hungarian and Romany populations of Eastern Hungary. *Br J Haematol* 1999; 107: 464-5
- Tag CG. et al. An unusual melting curve profile in LightCycler multiplex genotyping of the hemochromatosis H63D/C282Y gene mutations. *Clin Biochem*. 2001;34:511-5.
- Toglia MR, Weg JG. Venous thromboembolism during pregnancy. *N Engl J Med*. 1996;335(2):108-14.
- Tosi M. 1998. Molecular genetics of C1 inhibitor. *Immunobiology* 199: 358-365.

- Tosi M. et al. 1986. Molecular cloning of human C1 inhibitor: sequence homologies with alpha 1-antitrypsin and other members of the serpins superfamily *Gene*. 42: 265-72.
- Turner P. et al. Role of kinins in seasonal allergic rhinitis: icatibant, a bradykinin B2 receptor antagonist, abolishes the hyperresponsiveness and nasal eosinophilia induced by antigen. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:105-13.
- Vandenbroucke JP. et al. Factor V Leiden: should we screen oral contraceptive users and pregnant women? *BMJ*. 1996;313(7065):1127-30.
- Verpy E. et al. 1996. Exhaustive mutation scanning by fluorescence-assisted mismatch analysis discloses new genotype-phenotype correlations in angioedema. *Am J Hum Genet* 59: 308-319.
- von Ahsen N. et al. Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), factor V (G1691A), and methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) by real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clin Chem*. 1999;45:694-6.
- Waheed A. et al. Hereditary haemochromatosis: Effects of C282Y and H63D mutations on association with β 2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12384-9.
- Walker RA. et al. Use of a LightCycler gyrA mutation assay for rapid identification of mutations conferring decreased susceptibility to ciprofloxacin in multiresistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 isolates. *J Clin Microbiol*. 2001;39:1443-8.
- Wehnert, M. et al. Four STR polymorphisms map to a 500 kb region between DXS15 and DXS134. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1503.
- Weinberg, ED. Iron withhold: a defense against infection and neoplasia. *Physiol Rev* 1984; 64: 65-102.
- Weinstein DA. et al. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood* 2002;100:3776–81.
- Whitfield, JB. et al. Effects of HFE C282Y and H63D polymorphisms and polygenic background on iron stores in a large community sample of twins. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1246-58.
- Williams A, Baird LG. DX-88 and HAE: a developmental perspective. *Transfusion Apheresis Sci* 2003;29:255-8.
- Windsor, S. et al. Direct detection of a common inversion mutation in the genetic diagnosis of severe hemophilia A. *Blood* 1994; 84: 2202-5.
- Winkelstein JA. et al. Genetically determined disorders of the complement system. pp. 3911-31. in: Scriver, CR et al. (eds): *The metabolic and molecular bases of inherited disease* vol III, McGraw-Hill, 1995, 7th edition.
- Witte, DL. et al. Practice Guideline Development Task Force of the College of American Pathologists: Hereditary haemochromatosis. *Clin Chim Acta* 1996; 245: 139-200.
- Wittwer CT. et al. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 1997;22:130-138.
- Zhang MQ. 1998. Statistical features of human exons and their flanking regions. *Hum Mol Genet* 7: 919-932.

Zuraw BL. Herschbach J. 2000. Detection of C1 inhibitor mutations in patients with hereditary angioedema. J Allergy Clin Immunol 105: 541 – 546.

(összesen 155 hivatkozás)

VII. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CI: megbízhatósági (konfidencia) tartomány	kb: kilobázis
CVS: chorion boholy minta	MDS: myelodysplasiás szindróma
DE: Debreceni Egyetem	OGYK: Országos Gyógyintézeti Központ
DNS: dezoxiribonukleinsav	OR: kockázati hányados (odds ratio)
EDTA: etilén diamin tetraecetsav	PA: peak area (LightCycler paraméter)
FV Leiden: az V. alvadási faktor Leiden mutációja	PCR: polimeráz láncreakció
HA: A típusú hemofília	RFLP: restrikciós fragment hosszúság polimorfizmus
HANO: örökletes angioneurotikus oedema	SD: standard deviáció
HB: B típusú hemofília	IVS (intervening sequence): intron
HFE: a felnőttkori (klasszikus) hemokromatózis génje	CA: citozin-adenin (CA) ismétlődő szekvenciák
JH: fiatalkori hemokromatózis	ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

VIII. FÜGGELÉK

A dolgozat alapjául szolgáló 11 saját közlemény teljes terjedelemben, az V.1. fejezet szerint.